



***Cocos nucifera* L.: Untersuchung zur Wirkung von
Extrakten auf Parasiten**

***Cocos nucifera*: Untersuchungen zur Wirkung von
Extrakten auf Parasiten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Bianca Straßen
aus Ratingen

Düsseldorf 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Arbeit eingereicht am:

Mündliche Prüfung am:

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Mehlhorn
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Greven

Einleitung.....	1
1.1. Allgemein	1
1.2. Pflanzliche Naturstoffe mit anthelminthischer Wirkung	1
1.3. Die Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	3
1.3.1. Merkmale	3
1.3.2. Verbreitung	6
1.3.3. Verwendung	6
1.3.4. Anwendung der <i>Cocos nucifera</i> in der traditionellen Medizin	8
1.4. Wirkstoff Screening	8
1.5. Testorganismen	9
1.6. Ziel dieser Arbeit	10
2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus.....	11
2.1. Helminthen	11
2.1.1. <i>Trichuris muris</i>	11
2.1.2. <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	13
2.1.3. <i>Toxocara cati</i> (syn. <i>mystax</i>)	14
2.1.4. <i>Hymenolepis microstoma</i>	15
2.1.5. <i>Hymenolepis diminuta</i>	16
2.1.6. <i>Taenia taeniaeformis</i>	17
2.1.7. <i>Echinostoma caproni</i>	17
2.1.8. <i>Fasciola hepatica</i>	18
2.2. Protozoen	20
2.2.1. <i>Trichomonas muris</i>	20
2.2.2. <i>Eimeria papillata</i>	20
3. Material und Methoden.....	21
3.1. Präparative und analytische Methoden	21
3.1.1. Probenmaterial	21
3.1.2. Etablierung eines Extraktionsverfahrens	21
3.1.2.1. Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Pflanzengeweben der <i>Cocos nucifera</i> mit Acetonitril	21
3.1.2.2. Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polaritäten	22
3.1.2.3. Überprüfung der Thermostabilität	23
3.1.2.4. Überprüfung von Proteinen und	

Peptiden auf ihre Wirksamkeit	24
3.1.3. Isolierung und Reinigung	24
3.1.3.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion	24
3.1.3.2. Auswahl eines geeigneten Fließmittels mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	27
3.1.3.3. Mitteldruck-Säulenchromatographie	28
3.1.3.4. Präparative Dünnschichtchromatographie	29
3.1.4. Spektroskopische Methoden	31
3.1.4.1. Gaschromatographie gekoppelt mit Massen- spektroskopie	31
3.1.4.2. NMR-Spektroskopie	32
3.2. Parasitologische Methoden	32
3.2.1. Stammhaltung und Infektion von Versuchstieren	32
3.2.1.1. <i>Trichuris muris</i>	32
3.2.1.2. <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	32
3.2.1.3. <i>Toxocara cati</i>	33
3.2.1.4. <i>Hymenolepis microstoma</i>	33
3.2.1.5. <i>Hymenolepis diminuta</i>	33
3.2.1.6. <i>Taenia taeniaeformis</i>	34
3.2.1.7. <i>Echinostoma caproni</i>	34
3.2.1.8. <i>Fasciola hepatica</i>	34
3.2.1.9. <i>Eimeria papillata</i>	34
3.2.1.10. <i>Trichomonas muris</i>	35
3.2.2. Bestimmung des Infektionsgrads der Versuchstiere	35
3.2.3. Bestimmung der Wurmlast	35
3.2.4. Etablierung eines Bioassays	35
3.2.5. In-vivo-Behandlungsversuche mit <i>T. muris</i> infizierten Gerbils (Pharmakologische Methoden)	36
3.2.5.1. Überprüfung der Hitzestabilität des Wirkstoffs	37
3.2.5.2. Überprüfung der Wirksamkeit der Hexan- und Ethanolphase	37
3.2.5.3. Überprüfung der Wirksamkeit der Chloroform- und Wasserphase aus der Polyphenolextraktion	38
3.2.5.4. Überprüfung der Wirksamkeit der bei der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen 4-6 und 8-14	38

3.2.5.5. Dosis-Wirkungsbeziehung	39
3.2.5.6. Überprüfung der Wirksamkeit von α -Monolaurin in-vitro	40
3.2.5.7. Überprüfung der Wirksamkeit von α -Monolaurin in-vivo	41
3.2.5.8. Überprüfung der Wirksamkeit von o-Hydroxybiphenyl in-vitro	41
3.2.5.9. Überprüfung der Wirksamkeit von o-Hydroxybiphenyl in-vivo	41
3.2.5.10. Überprüfung der Wirksamkeit des Extrakts CHLO_1 auf die Larven der Nematodenart <i>T. muris</i>	42
3.3. In-vivo-Behandlungsversuche an anderen Parasitenspezies	43
3.3.1. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Hymenolepis microstoma</i> infizierten NMRI-Mäusen	43
3.3.2. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Hymenolepis diminuta</i> infizierten Wistar-Ratten	43
3.3.3. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Fasciola hepatica</i> infizierten Wistar-Ratten	44
3.3.4. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Angiostrongylus cantonensis</i> infizierten Wistar-Ratten	45
3.3.5. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Echinostoma caproni</i> infizierten Balb/C-Mäusen	45
3.3.6. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei einer mit <i>Toxocara cati</i> infizierten Hauskatze	46
3.3.7. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Taenia taeniaeformis</i> infizierten Hauskatzen	46
3.3.8. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Eimeria papillata</i> infizierten Balb/C-Mäusen	46
3.3.9. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit <i>Trichomonas muris</i> infizierten Gerbils	47
3.4. In-vitro-Tests mit verschiedenen Wurmspezies	47
3.4.1. <i>Hymenolepis microstoma</i>	47
3.4.2. <i>Fasciola hepatica</i>	48
3.4.3. <i>Echinostoma caproni</i>	48

3.5. Morphologische Untersuchungen zur Wirkweise der Extrakte aus <i>Cocos nucifera</i> beim Parasitenmodell <i>T. muris</i>	48
3.5.1. Fixierung	48
3.5.2. Rasterelektronenmikroskopie	48
3.5.3. Einbettung in EPON	49
3.5.4. Lichtelektronenmikroskopie	50
3.5.4.1. Totalpräparate	50
3.5.4.2. Semidünnschnitte	51
3.5.5. Transmissionselektronenmikroskopie	51
3.5.5.1. Ultradünnschnitte	51
4. Ergebnisse.....	52
4.1. Aktivitätsüberprüfung verschiedener Gewebe von <i>Cocos nucifera</i>	52
4.2. Entwicklung eines Extraktionsverfahrens	53
4.2.1. Lösungsmittel	53
4.2.2. Überprüfung der Thermostabilität	54
4.2.3. Aktivitätsüberprüfung von Proteinen und Peptiden der Kokosnuss	55
4.2.4. Isolierung und Reinigung	55
4.2.4.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion	55
4.2.4.2. Entwicklung und Optimierung eines Fließmittels mit Hilfe der DC	56
4.2.4.3. Mitteldruck-Säulenchromatographie	57
4.2.4.4. Präparative Dünnschichtchromatographie	59
4.3. Strukturanalyse	62
4.3.1. GC-MS-Analyse	62
4.3.2. NMR-Spektroskopie	67
4.4. Etablierung eines Bioassays	68
4.5. In-vivo-Behandlungsversuche	69
4.5.1. Überprüfung der Hitzestabilität	69
4.5.2. Aktivitätsüberprüfung der Hexan- und Ethanol-Phase	71
4.5.3. Aktivitätsüberprüfung der Chloroform- und der Wasser-Phase	73

4.5.4. Aktivitätsüberprüfung der Fraktionen 4-6 und der Fraktionen 8-14	75
4.5.5. Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung	76
4.5.6. Aktivitätsüberprüfung auf die Larven von <i>T. muris</i>	79
4.5.7. Aktivitätsüberprüfung von α -Monolaurin	80
4.5.7.1. In-vitro-Versuch	80
4.5.7.2. In-vivo-Versuch	80
4.5.8. Aktivitätsüberprüfung von o-Hydroxybiphenyl	81
4.5.8.1. In-vitro-Versuch	81
4.5.8.2. In-vivo-Versuch	82
4.6. In-vivo-Behandlungsversuche von unterschiedlichen Parasitenspezies	83
4.6.1. Wirkung auf <i>H. microstoma</i>	83
4.6.2. Wirkung auf <i>H. diminuta</i>	84
4.6.3. Wirkung auf <i>F. hepatica</i>	85
4.6.4. Wirkung auf <i>E. caproni</i>	86
4.6.5. Wirkung auf <i>A. cantonensis</i>	87
4.6.6. Wirkung auf <i>T. cati</i>	88
4.6.7. Wirkung auf <i>T. taeniaeformis</i>	89
4.6.8. Wirkung auf <i>Trichomonas muris</i>	90
4.6.9. Wirkung auf <i>Eimeria papillata</i>	90
4.7. In-vitro-Behandlungsversuche an unterschiedlichen Parasitenspezies	91
4.7.1. Aktivitätsüberprüfung bei <i>H. microstoma</i>	91
4.7.2. Aktivitätsüberprüfung bei <i>F. hepatica</i>	91
4.7.3. Aktivitätsüberprüfung bei <i>E. caproni</i>	92
4.8. Morphologische Untersuchungen am Parasitenmodell <i>T. muris</i>	93
4.8.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Totalpräparate	93
4.8.2. Semi-Dünnschnitte	94
4.8.2.1. Kutikula, Hypodermis, Muskulatur und Nervensystem	94
4.8.2.2. Darm	95
4.8.2.3. Weibliches Geschlechtssystem	95
4.8.2.4. Männliches Geschlechtssystem	96

4.8.3. Ultra-Dünnschnitte	97
4.9. Morphologische Untersuchungen an <i>Hymenolepis microstoma</i>	99
4.9.1. Semi-Dünnschnitte	99
4.9.2. Ultra-Dünnschnitte	99
5. Diskussion.....	100
5.1. Identifizierung des aktiven Wirkstoffs aus der Kokosnuss	100
5.2. Einsatzmöglichkeiten der Kokosnuss bei parasitischen Erkrankungen	102
5.3. Morphologische Befunde	105
5.4. Bewertung der Versuchsergebnisse	109
6. Zusammenfassung.....	111
7. Summary.....	113
8. Literaturverzeichnis.....	115
9. Abkürzungsverzeichnis.....	124
10. Abbildungen.....	126
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Allgemein

Seit jeher werden viele Pflanzen in allen Teilen der Welt zur Heilung bzw. Behandlung der verschiedensten Krankheiten verwendet (Giove 1996, Cano et al. 2004, Alanis et al. 2005), denn wie der Volksmund weiß: gegen jede Krankheit ist ein Kraut gewachsen. Doch welches Kraut gegen welche Krankheit hilft, wissen oft nur noch die Eingeweiheten. Es erscheint daher sinnvoll, die in der Ethnobotanik aufgeführten Pflanzen auf ihre Aktivität hin zu untersuchen und den zugrunde liegenden Wirkstoff zu analysieren. Für die Abwehr von Schädlingen steht Pflanzen ein vielfältiges Repertoire an physikalischen und chemischen Methoden zur Verfügung. Neben den passiven, mechanischen Barrieren (Blatthaare, Wachsschicht, Dicke und Festigkeit der Zellwand) sind es oft auch aktive Mechanismen, mit deren Hilfe sie durch die Synthese oder Freisetzung von chemischen Substanzen eine Vielzahl ihrer Feinde bekämpfen. Bei diesen Substanzen handelt es sich weitgehend um sekundäre Pflanzenstoffe, wie z.B. Phenole, Alkaloide, Amine etc. Von allen Substanzen im Einsatz gegen Krankheiten haben die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe die längste Tradition in der Medizingeschichte. Viele der heute bekannten Arzneimittel stammen ehemals von Naturstoffen ab, wie z.B. Aspirin® (Acetylsalicylsäure– entwickelt aus der Salicylsäure des Mädesüß (*Filipendula ulmaria*) (Kuhnert 1999).

Auf der Suche nach Möglichkeiten zur Entwicklung moderner und neuer Arzneistoffe bietet die Natur unvergleichliche Ressourcen an chemisch-struktureller Vielfalt. Zwar werden heutzutage unzählige Verbindungen synthetisch hergestellt, dennoch wird es unmöglich sein, die Naturverbindungen vollkommen zu ersetzen. So sind z.B. in der Naturstoffdatenbank „Dictionary of Natural Products“ 40% der aufgeführten Verbindungen nicht synthetisch hergestellt (Henkel 1999). Von den 520 zwischen 1983 und 1994 neu zugelassenen Arzneistoffen waren 39% Naturstoffe oder deren Derivate (Cragg et al. 1997), und neun von 20 der meistverkauften Arzneistoffe im Jahre 1999 waren von Leitstrukturen aus der Natur abgeleitet, wobei Proteine in dieser Statistik noch nicht berücksichtigt worden waren (Harvey 2000).

1.2. Pflanzliche Naturstoffe mit anthelminthischer Wirkung

Nur wenige pflanzliche Inhaltsstoffe sind in der Lage, Eingeweidewürmer abzutöten. Es gibt jedoch einige Pflanzen, die eine bekannte anthelminthische Wirkung haben. Dabei liegen hier sehr unterschiedliche chemische Strukturen zugrunde. Eines der ältesten Pflanzenpräparate ist der Extrakt des Wurzelstocks des Wurmfarne (*Dryopteris filix-mas*), der neben diversen ätherischen Ölen, Kohlenhydraten und Harzen ein Phloroglucinderivat

namens Filicin enthält (Hill 1952). Heute werden Präparate des Wurmfarns aufgrund leichter Toxizität nicht mehr angewendet (Bown 1995). Schwefelhaltige Verbindungen und Flavonoide der Küchenzwiebel (*Allium cepa*) und des Knoblauchs (*Allium sativum*) sollen ebenfalls eine wurmabtreibende Wirkung haben (Giove 1996). Die anthelminthische Wirkung des Kürbis (*Cucurbita maxima*) beruht auf der Aminosäure Cucurbitin (Giove 1996; Rybaltovskii 1966). Der Wermut (*Artemisia absinthum*) wird ebenfalls als Anthelminthikum empfohlen. Hier soll Absinthin, ein dimeres Sesquiterpenlacton der aktive Inhaltsstoff sein. Ein als Ascaridol bezeichneter Inhaltsstoff der Vertreter der Gänsefüßchen (*Chenopodium ambrosioides*) wirkt ebenfalls wurmabtötend (Giove 1996, MacDonald et al. 2004). Es handelt sich dabei um ein Terpenperoxid. Ein Vertreter der Palmen, die *Areca catechu* (Betelnuss) beinhaltet das Alkaloid Arecolin, dem auch eine anthelminthische Wirkung nachgewiesen wurde (Roepke 1996).

Ein weiterer Vertreter der Palmen, die Kokospalme (*Cocos nucifera*), soll neben vielen anderen in der Ethnobotanik beschriebenen Einsatzmöglichkeiten ebenfalls eine wurmabtötende Wirkung besitzen (Duke und Wain 1981, Chiej 1984, Amorim und Borba 1995, Martinez und Beltran 1999). Die hier zugrunde liegenden Verbindungen sind jedoch bisher nicht weiter untersucht worden und sollen in der vorliegenden Arbeit näher aufgeklärt werden.

Ein häufiges Problem der in Tabelle 1.1. genannten Medikamente, die zur Zeit bei der Therapie von Helminthenerkrankungen vor allem bei Nutztieren angewendet werden, ist neben den stärker werdenden Resistenzen, dass bei der Verabreichung solcher Medikamente bei Tieren, die dem Verzehr dienen bzw. in der Milchwirtschaft eingesetzt werden, teilweise erhebliche wirtschaftliche Einbußen für die Betriebe entstehen können. Nach der Behandlung erkrankter laktierender Tiere, beispielsweise mit Moxidectin müssen Wartephase von bis zu 60 Tagen eingehalten werden. In dieser Zeit darf die Milch nicht in den Handel gelangen, die Tiere müssen aber weiterhin gemolken werden. Auch Fleisch darf während dieser Wartezeit nicht in den Handel gelangen (Löscher et al 1999). Ökobauern dürfen generell keine synthetischen Anthelminthika zur Prophylaxe ihrer Nutztiere verwenden und sind daher gänzlich auf Wirkstoffe biogener Herkunft angewiesen (EG-Verordnung 2005).

1. Einleitung

Tab. 1.1.: Wirkungsspektrum verschiedener Anthelminthika gegen Helminthen bei Rind und Schaf (nach Löscher et. al 1999)

Anthelminthikum	Helminthengattungen bei Rind und Schaf					Resistenzen	Wartezeiten	
	<i>Haemonchus</i>	<i>Ostertagia</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Fasciola</i>		Milch	Essbares Gewebe
<u>Benzimidazole</u>								
Thiabendazol	xx	(x)1	xx	- 1	0	vorhanden	0 Tage	0 Tage
Mebendazol	xx	(xx)	xx	-	0	vorhanden	n.g.	14 Tage
Albendazol	xx	xx 2	xx	-	(x)1	vorhanden	5 Tage	28 Tage
Fenbendazol	xx 2	xx 2	xx	(x)	0	vorhanden	3 Tage	5-7 Tage
<u>Tertrahydropyrimidine</u>								
Pyrantel	(xx)				0	keine	0 Tage	14 Tage
Morantel	xx				0	bei <i>Haemonchus/Trichostrong./Ostertagia</i>	?	7 Tage
<u>Imidazothiazole</u>								
Levamisol	xx	xx	xx		0	bei <i>Haemonchus/Trichostrong.</i>	3 Tage	8 Tage
<u>Avermectine</u>								
Ivermectin	xx	xx 2	xx	(-)	0	keine	38 Tage	38 Tage
Doramectin	xx	xx 2	Xx	(-)	0	keine	n.g.	50 Tage
<u>Milbemycine</u>								
Moxidectin	xx	xx 2	xx	(-)	0	keine	60 Tage	35 Tage

Wirksamkeit: xx : >90%

x: >80%

-: <80%

0: unzureichend oder gar nicht vorhanden

n.g.: nicht zum Verzehr geeignet

Angaben in Klammern: Wirkung nur gegen adulte Formen

1 Wirkung bei erhöhter Dosis oder mehrfacher Gabe

2 Wirkung gegen inhierte Larvenstadien

1.3. Die Kokospalme (*Cocos nucifera*)

1.3.1. Merkmale

Die Kokospalme (*Cocos nucifera* L.) gehört zur Familie der Palmen (*Arecaceae*). Sie ist eine monokotyle (einkeimblättrige) Pflanze, die eine Höhe von bis zu 30 m erreichen kann. Palmen sind Schopfbäume, die nur am oberen Ende des kräftigen, schlanken und biegsamen Stammes eine mit 25-35 gefiederte Blätter (2-6 m lang) Krone bilden (Abb. 1.2.).

1. Einleitung

Ein Blatt besteht aus 200 bis 250 schmalen Einzelfiedern. An den Achseln jedes neu gebildeten Blattes entsteht ab dem 6. Lebensjahr ein Blütenstand, der aus vielen Seitenzweigen besteht. An den oberen Teilen der Seitenzweige befinden sich in großer Anzahl die 200-300 männlichen Blüten, an der Basis entspringen die 20-40 größeren weiblichen Blüten (Abb. 1.2.). Bei der Kokospalme erfolgt stets Fremdbefruchtung. Die Reifung der eiförmigen 30-45 x 15-20 cm großen Steinfrüchte dauert etwa 12-14 Monate, wobei die Früchte ein Gewicht von bis zu 2500 g erreichen können. Der botanische Begriff Steinfrucht bedeutet hier: die Früchte sind von einer glatten, wachsüberzogenen Außenhaut, dem Epi- oder Exokarp umgeben. Das Mesokarp bildet eine darunter liegende dicke Faserschicht, die das steinharte Endokarp umschließt (Shivashankar 1991) (Abb. 1.3.). Das Endokarp enthält das Endosperm – den Samen, der zumeist im Handel erhältlich ist. Der Steinkern ist innen hohl, in dem sich ab dem 3. Monat das Kokoswasser (flüssiges Endosperm) bildet. Aus diesem entwickelt sich im Laufe der Reifung ein festes, weißes Endosperm (7.-12. Monat) (Shivashankar 1991).

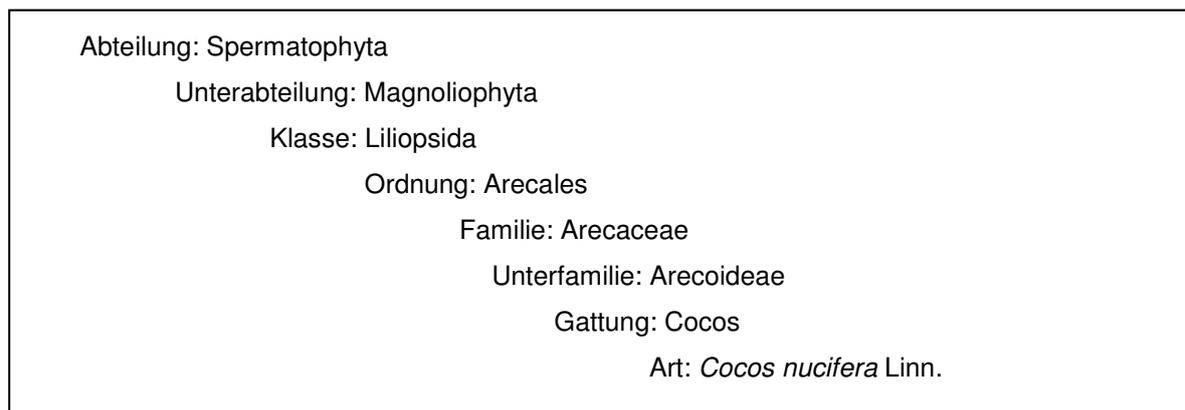


Abb. 1.1.: Systematik der Kokospalme (*Cocos nucifera*) (nach Franke 1994)



Abb. 1.2.: Bild 1: Aufnahme einer Kokospalme mit Früchten. Bild 2: Geöffnete reife Kokosnuss mit festem weißen Endosperm. Bild 3: Weibliche Blüten. Bild 4: Männliche Blüten.

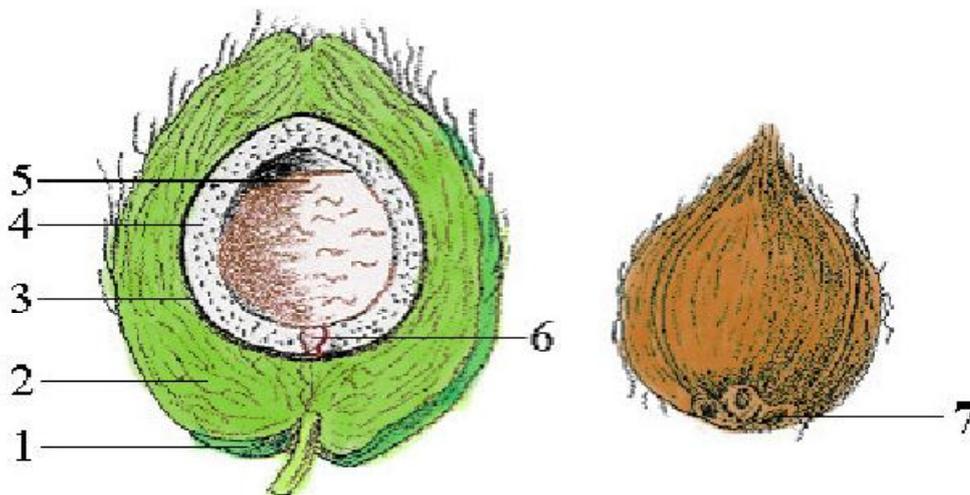


Abb. 1.3.: Schem. Längsschnitt durch eine Kokosnuss (links) und Aufsicht auf den Steinkern (rechts)

- 1 - Dünne, gelbbraune, wasserdichte Außenhaut (Exocarp)
- 2 - Dicke, faserige Mittelschicht (Kokosfaser, Mesocarp)
- 3 - Steinharte Innenschicht, der Steinkern (Endocarp)
- 4 - 1 - 2 cm dicke, weiße, ölhaltige Kopraschicht (festes Endosperm)
- 5 - Hohlkugel, gefüllt mit Kokoswasser (flüssiges Endosperm)
- 6 - Keimling
- 7 - "Augen" (3 grubchenförmige Keimporen)

Tab. 1.2.: Analyse von reifem und unreifem Kokosnuss-Wasser (Satyavati Krishnankutty 1987)

Inhaltsstoffe	Kokosnuss-Wasser reifer Früchte	Kokosnuss-Wasser unreifer Früchte
Reduzierende Zucker	0,2%	4,4%
Mineralien	0,5%	0,6%
Proteine	0,1%	0,01%
Fett	0,1%	0,01%
pH	5,2	4,5
Kalium	247,0 mg	290,0 mg
Natrium	48,0 mg	42,0 mg
Magnesium	40,0 mg	44,0 mg
Phosphor	15,0 mg	10,0 mg
Eisen	6,3 mg	9,2 mg
Kupfer	79,0 mg	106,0 mg

Der Zuckergehalt in Form von Glukose und Fruktose steigt während der Reifung der Nüsse in den ersten Monaten, danach nimmt er bis zur völligen Reifung wieder ab (Tab. 1.2.). In der reifen Nuss macht die Saccharose (Rohrzucker) den Hauptteil aus. Proteine sind in der Kokosnuss nur in geringem Maße vorhanden (Padera et al. 1942).

Weiterhin dient die Kokospalme als Brennholz, die Blätter und Stämme werden als Baumaterial eingesetzt, die Blüten dienen als Honiglieferant. Das Kokosöl bzw. Fett wird in großem Maße in der Kosmetikindustrie als Bestandteil von Shampoos, Cremes usw. verwendet. Auch findet es weltweit als Koch- und Bratfett Verwendung, da es auch bei sehr hohen Temperaturen stabil bleibt. Gesättigte Fettsäuren machen den größten Teil des Kokosfetts aus. Dabei sind Laurinsäure (40-55%) und Myristinsäure (15-20%) mengenmäßig dominant (Tab. 1.3.) (Kaunitz 1972).

Tab. 1.3.: Fettsäureanteil von Kokosnussöl (Kaunitz 1972)

Fettsäure	Kettenlänge	% Anteil
Capronsäure	C 6	0,5
Caprylsäure	C 8	6,5
Caprinsäure	C10	6,0
Laurinsäure	C12	49,5
Myristinsäure	C14	19,5
Palmitinsäure	C16	8,5
Stearinsäure	C18	2,0
Oleinsäure	C18 : 1	6,0
Linolsäure	C18 : 2	1,5

1.3.4. Anwendung der *Cocos nucifera* in der traditionellen Medizin

Die Kokosnuss besitzt in vielen tropischen Ländern ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten. So wird sie in der Volksmedizin beispielsweise zur Heilung von Diarrhöen und Arthritis eingesetzt. Ein Extrakt, gewonnen aus der Schale der Nuss, besitzt eine antibakterielle Wirkung gegen das Bakterium *Staphylococcus aureus* (Esquenazi et al. 2002). Im weiteren werden Bestandteile von *Cocos nucifera* bei der Heilung von Tumoren (Hartwell 1967-1971), zur Behandlung von Fieber, Zahnschmerzen, Tuberkulose und Syphilis herangezogen (Duke und Wain 1981). Nach neuen Erkenntnissen sollen bestimmte Komponenten der Kokosnuss ebenfalls eine gewisse Wirkung gegen das HI-Virus haben (Dayrit 2000). Hierfür sollen vor allem die mittellangen Fettsäureketten (MCT=medium-chain tryglycerides) verantwortlich sein. Den Polyphenolen der Kokoschale wird eine Wirkung gegen Leishmanien nachgesagt (Mendonca-Filho et al. 2004).

Vertreter mittelamerikanischer Völker verwenden die Kokosnuss als Heilmittel bei Wurmerkrankungen (persönliche Mitteilung einheimischer Mexikaner). Erste Ergebnisse, die einen Hinweis auf eine anthelminthische Wirkung der Frucht gaben, lieferte eine Studie brasilianischer Forscher (Amorim und Borba 1995). In dieser Studie wurde ein Extrakt aus den Früchten der Kokospalme in-vitro gegen Cestoden der Art *Vampirolepis nana* (syn. *Hymenolepis nana*) getestet und dabei eine abtötende Wirkung bestätigt. In meiner Diplomarbeit (Straßen 2002) konnte in in-vivo-Experimenten mit *Trichostrongylus colubriformis*-infizierten Gerbils ebenfalls eine anthelminthische Wirkung beobachtet werden.

1.4. Wirkstoff-Screening

Die analytische Chemie dient dem Nachweis, der Identifikation und der Strukturaufklärung unbekannter Substanzen. Jeder Analysegang untergliedert sich in vier Hauptschritte, beginnend mit der Probenentnahme, der Extraktion, einer meist chromatographischen Trennung zur Isolierung der gesuchten Substanz und schließlich der Detektion mittels spezifischer Methoden, wie z.B. der Spektroskopie (UV-Spektroskopie, Massenspektrometrie, Nuclear-Magnetic-Resonance-Spectroscopy, Dünnschicht-Chromatographie, High-Performance-Liquid-Chromatography etc.). Jeder dieser Teilschritte muss optimiert werden, um eine zuverlässige Analyse zu gewährleisten. Dabei besteht stets die Gefahr der Zersetzung oder Kontamination der zu untersuchenden Substanz. Um die biologische Aktivität der Extrakte bzw. später gewonnenen Fraktionen zu überprüfen, muss ebenfalls ein geeignetes und einfaches Testsystem (Bioassay) entwickelt werden, das auch bei niedrigen Konzentrationen schnell Rückschlüsse auf eine eventuelle Wirkung zulässt. Ansätze, die eine Aktivität zeigen, dienen als Anhaltspunkt für weitere Isolationschritte, bis

die gesuchte Wirkstoffkomponente gefunden ist. Bioassays sind zunächst den in-vivo-Tests vorzuziehen, da sie Verbrauch von Versuchstieren vermeiden und auf einfache Art und Weise eine große Anzahl an Proben untersucht werden kann. Allerdings muss eine in-vitro-Wirkung nicht unbedingt eine in-vivo-Wirkung garantieren.

1.5. Testorganismen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein möglichst breites Spektrum der Einsatzmöglichkeiten der Kokosnuss als Anti-Parasitikum abgegrenzt werden. Daher wurde zwar das Hauptaugenmerk auf Helminthen gesetzt, aber ebenfalls parasitäre Vertreter aus dem Reich der Protozoen als Testobjekte herangezogen. Der Lebenszyklus und die Besonderheiten der in Abbildung 1.6. aufgeführten Parasiten werden im Kapitel 2 beschrieben.

<p>Reich: ANIMALIA (Tiere)</p> <p>Unterreich: Protozoa (Einzeller)</p> <p>Stamm: Sarcomastigophora</p> <p> Unterstamm: Mastigophora (Flagellata)</p> <p> Ord.: Trichomonadida → Art: <i>Trichomonas muris</i></p> <p>Stamm: Sporozoa</p> <p> Unterklasse: Coccidia</p> <p> 1. Uord.: Eimeriina → Art: <i>Eimeria papillata</i></p> <p>Unterreich: Metazoa (echte Vielzeller)</p> <p>Stamm: Plathelminthes (Plattwürmer)</p> <p> Klasse: Trematodes</p> <p> 3. Unterklasse: Digenea → Art: <i>Echinostoma caproni</i></p> <p> → Art: <i>Fasciola hepatica</i></p> <p> Klasse: Cestodes</p> <p> 2. Unterklasse: Eucestoda</p> <p> Fam.: Hymenolepididae → <i>Hymenolepis microstoma</i></p> <p> → <i>Hymenolepis diminuta</i></p> <p> Fam.: Taeniidae → <i>Taenia taeniaeformis</i></p> <p>Stamm: Nemathelminthes</p> <p> Unterstamm: Nematodes (Fadenwürmer)</p> <p> Klasse: Adenophorea</p> <p> Fam.: Trichuridae → <i>Trichuris muris</i></p> <p> Klasse: Secernentea (Phasmidea)</p> <p> Fam.: Angiostrongylidae → <i>Angiostrongylus cantonensis</i></p> <p> Fam.: Toxocaridae → <i>Toxocara cati</i></p>

Abb. 1.6.: Überblick der verwendeten Testorganismen und deren systematische Zuordnung (nach Mehlhorn und Piekarski 1998)

1.6. Ziel dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Isolierung und Strukturaufklärung der anthelminthisch aktiven Bestandteile der Kokosnuss (*Cocos nucifera*). Dabei sollte ein einfaches Bioassay-System entwickelt werden, das wichtige Anhaltspunkte bei der Suche nach einem geeignetem Extraktionsverfahren und später bei der Isolierung bzw. Aufreinigung der gesuchten Substanzen mit Hilfe von verschiedenen Chromatographie-Verfahren gibt. Die Identifizierung des aktiven Wirkstoffs sollte anschließend anhand von spektroskopischen Methoden aufgeklärt werden. Anschließend in-vivo-Versuche mit verschiedenen Parasitenspezies sollen Aufschluss auf die Einsatzmöglichkeit und den eventuell daraus ersichtlichen Wirkmechanismus des neu entdeckten Wirkstoffs geben. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Trichuris muris* sollen strukturelle Schädigungen aufzeigen und Spekulationen auf mögliche Wirkmechanismen zulassen.

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

2.1. Helminthen

2.1.1. *Trichuris muris*

Die adulten, getrenntgeschlechtlichen Stadien des auch als Peitschenwurm bezeichneten Fadenwürmer *Trichuris muris* leben vorwiegend im Caecum, teilweise auch im Dickdarm von Mäusen (Fahmy 1954, Beer 1973). Die abgesetzten Eier der weiblichen Nematoden gelangen mit den Fäzes ins Freie. Dort entwickelt sich im Inneren der charakteristischen ovalen, mit Polpfropfen versehenen Eier (Abb. 3a) eine infektiöse Larve L1 (Abb. 3b). Die Entwicklung ist abhängig von Temperatur und Feuchtigkeit und dauert in der Regel etwa 56-63 Tage (Wakelin 1969). Werden solche infektiösen Eier erneut von Mäusen oral aufgenommen, so schlüpfen die Larven bereits nach einer Stunde (Olsen 1974), wandern nach 4-5 Stunden in die Caecummukosa und dringen anschließend in das Epithel ein. Nach spätestens 4-5 Tagen verlassen alle Larven das Caecumepithel und wandern an die Oberfläche der Mukosa (Wakelin 1969, Eckert et al. 2005). Dort entwickeln sich nach zwei weiteren Häutungen die adulten Nematoden. Charakteristisch für Trichuroiden, ist die peitschenähnliche Gestalt mit einem sehr langen, dünnen Vorderende, das etwa 2/3 des gesamten Wurmes ausmacht (Abb. 1). Dieser Vorderteil ist fest in der Darmschleimhaut verankert und verläuft meist in tunnelartigen Gängen in der Epithelschicht oder dicht darunter, zum Teil auch in tieferen Bereichen der Lamina propria. Die Lamina muscularis mucosae wird jedoch nie durchdrungen (Eckert et al. 2005). Das gesamte Vorderende dieser Nematoden enthält den Oesophagus mit den Stichosom-Zellen (Chietwood 1930). Eine Besonderheit bei allen Trichuroiden ist die Präsenz eines „Bacillary bands“ an der Außenseite des Wurmes (Abb. 5). Die hintere dickere Hälfte des Wurmes mit den Geschlechtsorganen ist der einzige Teil, der in das Darmlumen des Wirtstieres ragt (Abb. 90). Die Weibchen setzen nach ca. 35 Tagen erneut Eier ab, die mit dem Kot ausgeschieden werden.

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

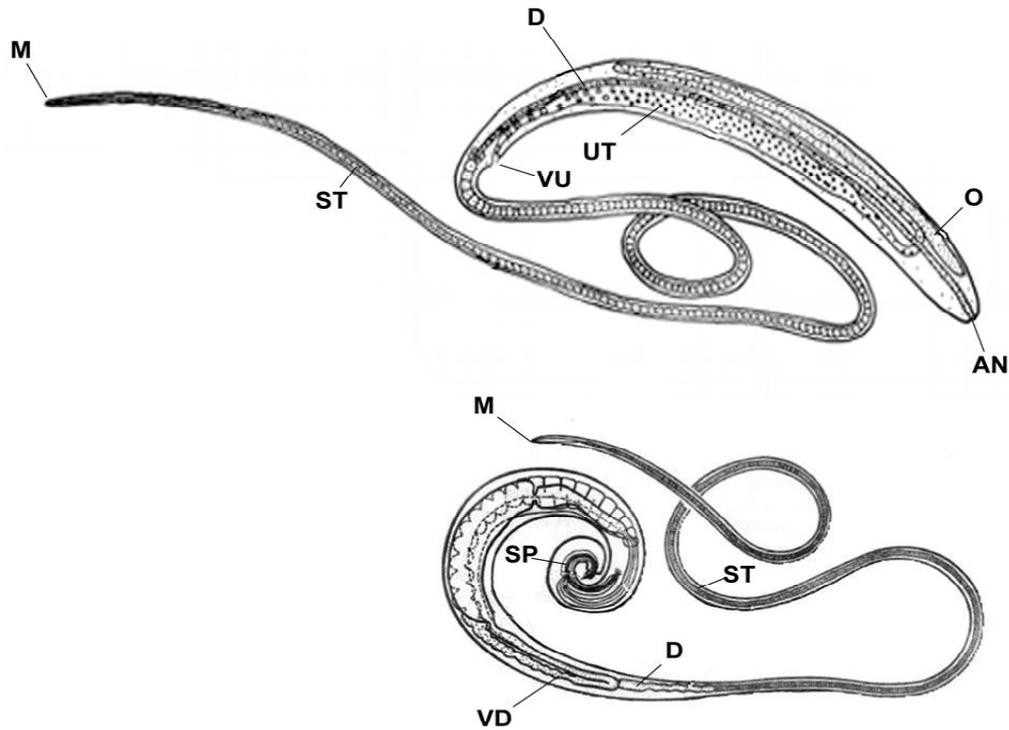
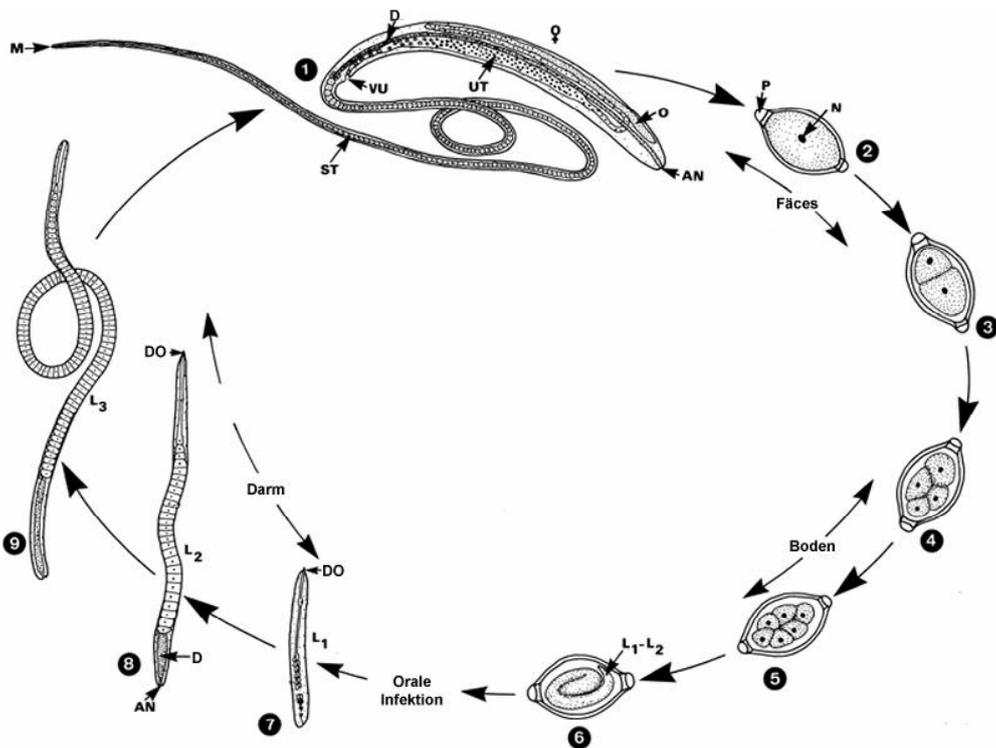


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung eines weiblichen und männlichen *Trichuris muris*-Nematoden (nach Mehlhorn 2001)

AN = Anus, D = Darm, M = Mund, O = Ovar, SP = Spiculum, ST = Stichosom, UT = Uterus, VD = Vas deferens, VU = Vulva



2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

Abb. 2.2.: Lebenszyklus von *Trichuris muris* (nach Mehlhorn 2001)

- 1 Adulte männliche und weibliche *T. muris* in der Mukosa des Caecums des Gerbils/Maus.
- 2 Unembryonierte Eier gelangen mit den Fäzes ins Freie.
- 3-6 Im Boden entwickeln sich die Eier über mehrere Zellstadien zur infektiösen Larve L1
- 7 Nach oraler Aufnahme schlüpft die Larve 1 im Dünndarm des Wirts.
- 8-9 Über mehrere Larvalstadien entwickeln sich schließlich die Adulten im Caecum des Wirts.

AN = Anus, D = Darm, DO = Dorn, L1-L3 = Larvenstadien, M = Mund, N = Nukleus, O = Ovar, P = Polpfropfen, ST = Stichosom, UT = Uterus, VU = Vulva

2.1.2. *Angiostrongylus cantonensis*

Der Nematode *Angiostrongylus cantonensis*, der auch als Rattenlungenwurm bekannt ist, findet sich vorwiegend in den Lungenpulmonalarterien und vereinzelt auch in der rechten Herzkammer von Säugern. Als Endwirte dienen meist Ratten und *Bandicota*-Arten. Die weiblichen Nematoden legen Eier ab, in denen sich bereits im Wirt noch die Larven L1 entwickeln. Diese Larven wandern nach dem Schlüpfen aus dem Ei über die Trachea in den Pharynx und werden anschließend mit den Fäzes ausgeschieden. Eine Anzahl von Schnecken und Crustaceen dienen als Zwischenwirte (Prociv et al. 2000). In der Muskulatur der Zwischenwirte entwickeln sich die infektiösen Larven L3 innerhalb von 2 Wochen (Richards und Merritt 1967). Nimmt der Endwirt durch den Verzehr der Zwischenwirte die infektiösen Larven auf, so penetrieren sie im Dünndarm die Darmwand und gelangen mit dem Blutstrom ins ZNS, wo sie sich im Kleinhirn der Ratten ansiedeln (Mackerras und Sandras 1955). Nach 10-11 Tagen entwickeln sich über L4 Larven die getrenntgeschlechtlichen Adultwürmer. Diese wandern aus dem Gehirn über Blutgefäße, Herz und Lunge in das Blutgefäßsystem und bleiben in den Pulmonalarterien, wo sie sich von Blut ernähren (Mackerras und Sandras 1955). Die weiblichen Adultwürmer legen unembryonierte Eier ab, die mit dem Blutstrom zu den Kapillaren der Lungen gelangen und dort zu Trombenbildung führen. In der Lunge schlüpfen die L1 Larven nach etwa 40 Tagen (Weinstein et al. 1963). Die Larven wandern die Luftröhre hinauf, werden abgeschluckt und gelangen mit den Fäzes ins Freie.

In dieser Familie sind fünf Gattungen bekannt, von denen aber nur *A. cantonensis* als humanpathogen gilt. Sie verursacht beim Menschen eine eosinophile Meningoencephalitis (Rosen et al. 1962). Die Infektion des Menschen geschieht durch den Verzehr von rohen Mollusken und Crustaceen.

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

1. Eier werden von einer Katze (A) ausgeschieden und gelangen ins Freie
2. Im Freien entwickelt sich eine infektionsfähige Larve L2 im Inneren der Eier
3. Werden diese Eier von Menschen (B) oder einem anderen Zwischenwirt (Mäusen C) aufgenommen, kommt es zu einer Wanderlarve (Larva migrans visceralis). Werden Mäuse von einer Katze (D) gefressen oder nehmen Katzen larvenhaltige Eier auf, so entwickeln sich in ihnen die Adultwürmer im Darm. Die Übertragung von L3-Larven erfolgt auch über die Muttermilch beim Säugen.

2.1.4. *Hymenolepis microstoma*

Der zu den Cestoden zählende Bandwurm *Hymenolepis microstoma* lebt als Adultwurm in den Gallengängen von Mäusen. Dort ist er fest mit seinem Scolex verankert, während sein Hinterende mit den reifen Proglottiden bis in den Darm der Mäuse reicht (Andreassen et al 2004). Reife Eier bzw. mit reifen Eiern gefüllte Proglottidenstücke gelangen mit den Fäzes des Wirtstieres ins Freie. Um den Entwicklungszyklus zu vollenden, muss die in den Eiern enthaltene Oncosphaera-Larve von einem Zwischenwirt (meist Käfer, z.B. Mehlkäfer, Schaben etc.) oral aufgenommen werden. Im Haemocoel der Zwischenwirte schlüpft die Larve und entwickelt sich zu einem Cysticercoid. Bei der oralen Aufnahme dieser Insekten durch den Endwirt schließt sich der Zyklus, und es entwickeln sich erneut adulte Bandwürmer in dessen Gallengängen (Mehlhorn und Piekarski 1993).

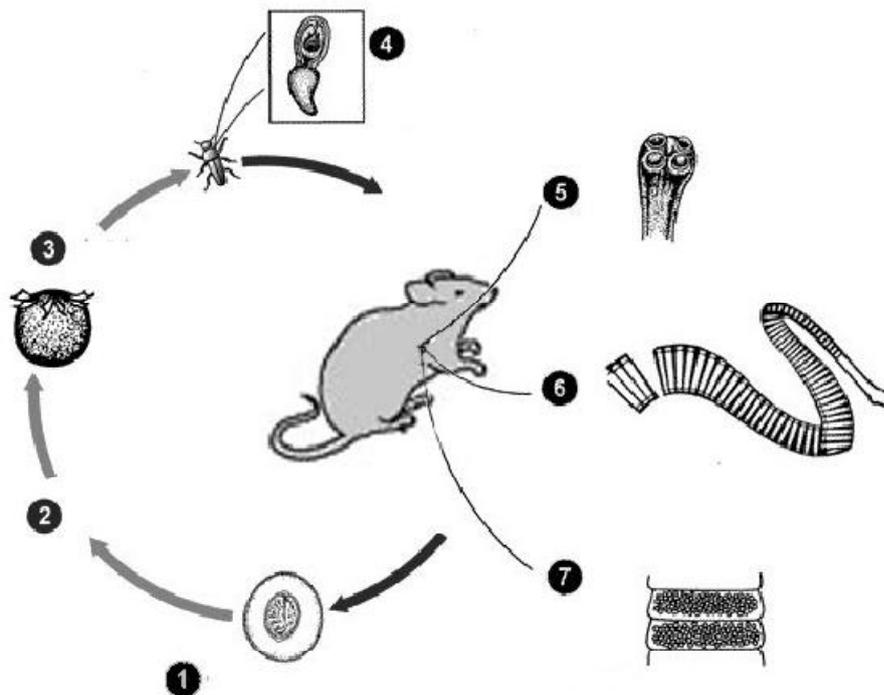


Abb. 2.4.: Entwicklungszyklus von *H. microstoma* (verändert nach CDC Division of Parasitic Diseases)

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

- 1 = reife Eier gelangen mit den Fäzes ins Freie.
- 2 = Eier mit der Oncosphaera-Larve werden vom Zwischenwirt (ZW) verzehrt.
- 3-4 = Im Inneren des ZW entwickelt sich ein Cysticeroid.
- 5-7 = Beim Verzehr des ZW entwickelt sich ein adulter Cestode mit reifen Proglottiden, der mit seinem Scolex im Gallengang des Endwirts verankert ist.

2.1.5. *Hymenolepis diminuta*

H. diminuta ist wie der bereits erwähnte *H. microstoma* ein Vertreter der Cestoden. Als Endwirte fungieren hier meist Nagetiere (z.B. Ratten), es besteht jedoch ebenso eine Infektionsgefahr für den Menschen (Mehlhorn et al. 1993, Marangi et al. 2003). Die adulten Bandwürmer sitzen mit ihren Scolices im oberen Dünndarmabschnitt, und zwar unterhalb des Magenausgangs. Mit reifen Eiern gefüllte Proglottiden gelangen über die Fäzes ins Freie, wo sie von einem Zwischenwirt, z.B. einem Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*), oral verzehrt werden. Im Inneren dieser Insekten entwickelt sich ein Cysticeroid, das bei der oralen Aufnahme durch den Endwirt in dessen Darm zu einem adulten Cestoden heranwächst.

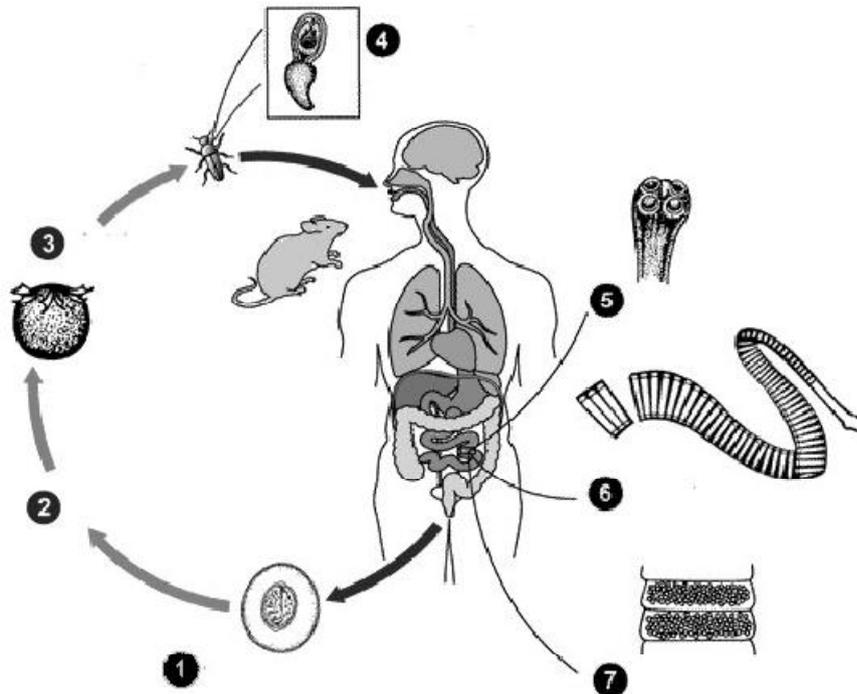


Abb. 2.5.: Entwicklungszyklus von *H. diminuta* (nach CDC Division of Parasitic Diseases)

- 1 = Reife Eier gelangen mit den Fäzes ins Freie.
- 2 = Eier mit der Oncosphaera-Larve werden vom Zwischenwirt (ZW) verzehrt.
- 3-4 = Im Inneren des ZW entwickelt sich ein Cysticeroid.
- 5-7 = Beim Verzehr des ZW entwickelt sich ein adulter Cestode mit reifen Proglottiden, der mit seinem Scolex im Dünndarm des Endwirts verankert ist.

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

2.1.6. *Taenia taeniaeformis*

Ein weiterer Vertreter der Cestoden, der sog. Katzenbandwurm, lebt adult im Dünndarm der Katze und erreicht dort eine Länge von ca. 60 cm (Mehlhorn und Mehlhorn 1993). Die mit reifen Eiern gefüllten Proglottiden lösen sich ab und gelangen durch Eigenbewegungen aus dem Anus des Wirtes ins Freie oder finden sich in den Fäzes. Die ausgeschiedenen Eier kontaminieren die Nahrung von Ratten, Mäusen und Kaninchen, die als Zwischenwirte fungieren. Im Darm dieser Zwischenwirte schlüpft die Oncosphaera-Larve, durchdringt die Darmwand und gelangt auf dem Blutweg in die Leber und wandelt sich dort in eine flüssigkeitsgefüllte Larve um, die als Cysticercus-Larve oder Blasenwurm bezeichnet wird. Hier ist der spätere Scolex des Adultwurms bereits eingestülpt vorhanden. Werden die infizierten Zwischenwirte schließlich von einer Katze verzehrt, so entwickelt sich die Larve erneut zu einem adulten Bandwurm im Dünndarm der Katze. Dort kann er ohne Behandlung bis zu zwei Jahre und länger überleben (Mehlhorn et al. 1993). Meist sind bei schwachem Befall bei der Katze keine klinischen Symptome festzustellen, jedoch kann es bei einem Massenbefall zu Abmagerung, Apathie, Schwäche und einem struppigem Fell kommen (Mehlhorn und Mehlhorn 1993).

2.1.7. *Echinostoma caproni*

Echinostoma caproni parasitiert vornehmlich im Dünndarm von Wasservögeln und wasserbewohnenden Säugetieren. Ein charakteristisches Merkmal dieser Trematoden ist ein mit Stacheln bewehrter Kragen, der den Mundsaugnapf umschließt. Auch der Rest der Körperoberfläche ist mit feinen Haken besetzt (Abb. 92). In den mit den Fäzes abgesetzten, unembryonierten, gedeckelten Eiern entwickeln sich innerhalb von 25-30 Tagen Miracidienlarven (Idris und Fried 1996). Voraussetzung für deren Schlüpfen ist Wasserkontakt des Eies. Im Wasser penetrieren die Miracidienlarven den ersten Zwischenwirt, eine Wasserschnecke (Gatt. *Lymnaea*), in der sie sich über mehrere Vermehrungsstadien (Sporocyste I, Redien I + II) zu Cercarien entwickeln. Diese penetrieren einen zweiten Zwischenwirt (z.B. andere Schnecken, aber auch Kaulquappen und Muscheln). In diesen Zwischenwirten kapseln sich die Cercarien als Metacercarien ein und warten auf den Verzehr durch einen Endwirt, z.B. Vogel oder Bisamratte. Im Endwirt wächst die Metacercarie wieder zu einem adulten Trematoden im Dünndarm heran (Richard und Brygoo 1978).

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

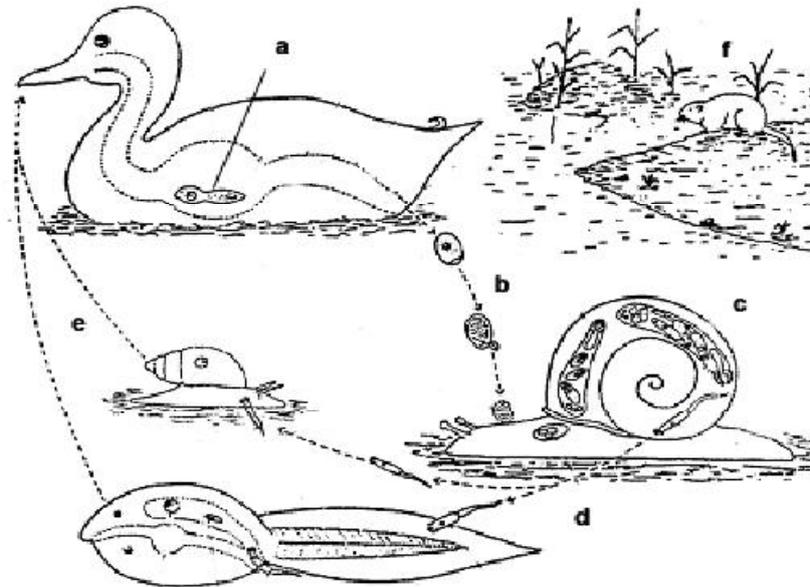


Abb. 2.6.: Entwicklungszyklus von *Echinostoma caproni* (verändert nach BIODIDAC, Livingstone)

- a) Adulter Trematode im Caecum eines Wasservogels.
- b) Gedeckelte, unembryonierte Eier gelangen mit den Fäzes ins Wasser. Aus ihnen schlüpft eine Miracidien-Larve, die sich in den 1. Zwischenwirt (ZW) (eine Schnecke) einbohrt.
- c) Aus dem Miracidium entwickeln sich über Sporocysten und Redien die Cercarien.
- d) Cercarien verlassen aktiv die Schnecke und penetrieren einen 2. ZW, der erneut eine Schnecke oder auch eine Kaulquappe sein kann. Die Cercarie kapselt sich als Metacercarie ein.
- e) Verzehr des 2. ZW durch einen Endwirt.
- f) Wasserbewohnende Säugetiere können ebenfalls als Endwirte fungieren.

2.1.8. *Fasciola hepatica*

Der als Großer Leberegel bezeichnete digene Trematode lebt adult in den Gallengängen von Wiederkäuern und nur selten beim Menschen. Dieser meist 2,5 bis 3 cm lange und 1,3 cm breite, lorbeerblattförmige Parasit ist weltweit verbreitet und führt in vielen Regionen mit starker Viehnutzung und Zucht zu erheblichen wirtschaftlichen Einbußen durch verminderte Milch-, Fleisch- und Wollproduktion (Genicot et al. 1991, Schweitzer et al. 2003). Der Entwicklungszyklus des Leberegels ist stets mit einem Wirtswechsel und somit an das Vorhandensein eines Zwischenwirts gebunden. Mit den Fäzes werden die unembryonierten Eier ins Freie abgegeben und sind von nun an eine Entwicklung im Wasser gebunden. Nach 3-4 Wochen schlüpft im Wasser aus den Eiern eine Miracidien-Larve, die sich in amphibisch lebende Schnecken (1. ZW) (in Europa *Lymnaea*-Arten) einbohrt (Mehlhorn et al. 1993). Aus den Miracidien entwickeln sich in der Leibeshöhle und in der Mitteldarmdrüse über

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

Sporocysten und Redien (I und II) schließlich die Cercarien. Diese dringen aktiv aus der Schnecke aus und enzystieren sich an Wasserpflanzen. Werden diese, mit Metacercarien verseuchten Wasserpflanzen, von den Endwirten oral aufgenommen, so enzystieren sich die Metacercarien im Magen bzw. Duodenum. Die Larven durchbohren die Darmwand und gelangen von der Leibeshöhle aus in die Leberkapsel. Im Leberparenchym wandern die Larven 6-8 Wochen, dringen schließlich in die Gallengänge ein und werden dort geschlechtsreif. Die von den adulten Trematoden abgesetzten Eier gelangen mit dem Gallensaft in den Darm und von dort via Fäzes ins Freie. Die Präpatenz dauert etwa 2-3 Monate (Mehlhorn et al. 1993). Nach Beobachtungen in Einzelfällen wird angenommen, dass der Leberegel maximal 9-13 Jahre überleben kann (Dan et al., 1981).

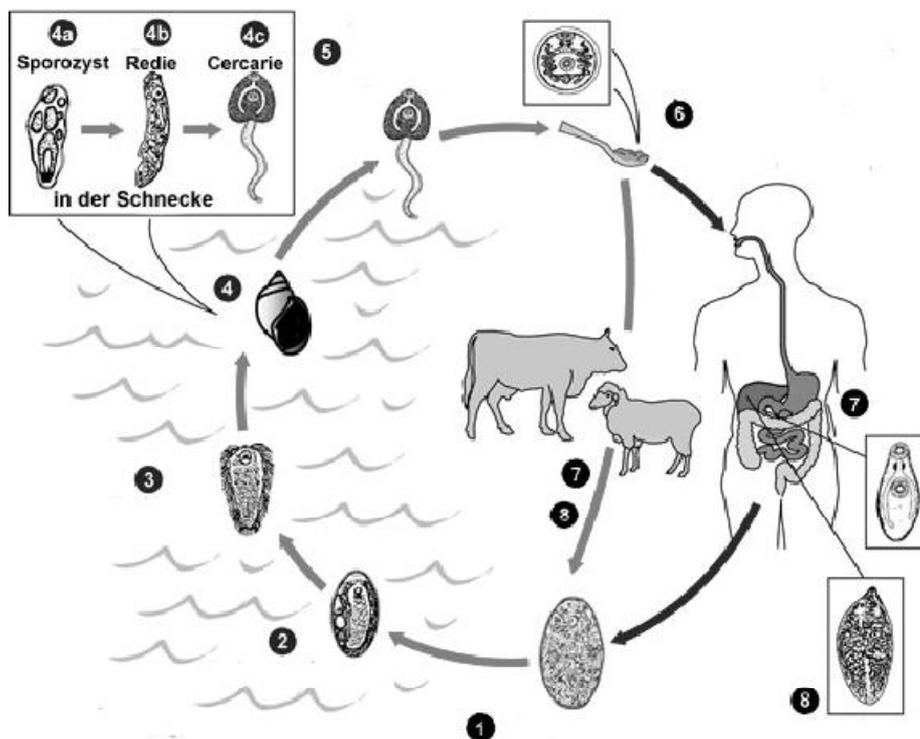


Abb. 2.7.: Entwicklungszyklus des Großen Leberegels *Fasciola hepatica* (nach CDC Division of Parasitic Diseases)

- 1 = Unembryonierte Eier gelangen mit den Fäzes ins Wasser.
- 2 = Entwicklung zur Miracidien-Larve innerhalb von 3-4 Wochen.
- 3 = Das Miracidium schlüpft und dringt in Schnecke ein.
- 4 = Aus dem Miracidium entwickeln sich über Sporocysten (4a), Redien (4b) die Cercarien (4c).
- 5 = Die Cercarie verlässt aktiv die Schnecke und enzystiert sich an Wasserpflanzen.
- 6 = Metacercarie wird oral mit der Wasserpflanze vom Endwirt aufgenommen.
- 7 = Larve in der Wanderphase im Leberparenchym.
- 8 = Adulter Trematode in den Gallengängen.

2. Testorganismen und deren Entwicklungszyklus

2.2. Protozoen

2.2.1. *Trichomonas muris*

Die zu den Protozoen zählenden Trichomonaden kommen sehr häufig im Colon oder Caecum der verschiedensten Nagetiere vor. Dabei ist die Art *T. muris* (bei Mäusen im Caecum) der größte Vertreter. Er misst 16 – 26 µm x 10 – 14 µm und besitzt keine nennenswerte Pathogenität. Das charakteristische Merkmal dieser tropfenförmigen Einzeller ist die definierte Anzahl von Flagellen. Dabei verläuft eine Geißel am Körper und dient als Schleppeißeil, die anderen 4 sind frei (Wenrich 2005). Die Übertragung von Trichomonaden erfolgt typischerweise durch direkten Körperkontakt, es werden meist wie bei *T. muris* keine Cysten gebildet. Die Vermehrung erfolgt durch Längsteilung der Trophozoiten.

2.2.2. *Eimeria papillata*

Eimerien gelten als die wichtigste und artenreichste Gruppe der Sporozoen (Mehlhorn und Piekarski 1998). Eine Infektion mit diesen Parasiten erfolgt durch die Aufnahme sporulierten Oocysten. Im Dünndarm der Mäuse werden die Sporozoiten frei, dringen in die Darmepithelzellen ein und entwickeln sich dort zu Schizonten. Durch mehrfache Zellteilung bilden sich Merozoiten (= Tochterzellen), die sich vom Rest des Schizonten lösen, aktiv in andere Wirtszellen eindringen und dann zu Schizonten heranwachsen.

3. Material und Methoden

3.1. Präparative und analytische Methoden

3.1.1. Probenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Kokosnüsse stammten z.T. aus der Dominikanischen Republik und wurden über einen Großhändler in Düsseldorf bezogen. Das feste, weiße Endosperm der Kokosnüsse wurde mit einem handelsüblichen Küchenmixer (Fa. Braun) fein zerkleinert und anschließend in einem Trockenschrank bei 40°C getrocknet. Zur weiteren Verarbeitung wurde das getrocknete Pflanzenmaterial in einer Kühlkammer bei -4°C aufbewahrt. Weitere Untersuchungsmaterialien, wie z.B. Rinde, Wurzel, Blätter, Schale der Nüsse bzw. Nüsse unterschiedlicher Entwicklungsstadien, stammten aus Mexiko. Rinde, Blätter, Schale und Wurzel wurden ebenfalls fein zermahlen und anschließend getrocknet. Das flüssige Endosperm (Kokoswasser) von jungen Kokosnüsse wurde tiefgefroren.

3.1.2. Etablierung eines Extraktionsverfahrens

3.1.2.1. Untersuchung verschiedener Geweben von *Cocos nucifera* mit Acetonitril

Dem Endosperm der Kokosnuss wird sowohl im flüssigen als auch im festen Zustand wird eine anthelminthische Wirkung nachgesagt (Nadkarni 1976, Martinez et al. 1999). Eine Überprüfung weiterer Gewebe der Pflanze auf ihre Aktivität hin sollte Klarheit über die Lokalisation von wirksamen Komponenten schaffen. Dazu wurden jeweils 0,5 g der gemahlene Pflanzenteile, wie Wurzel, Rinde, Schale der Nuss, Blätter und das feste Endosperm einer reifen Nuss in ausreichend Acetonitril als Lösungsmittel über Nacht extrahiert, anschließend filtriert und eingedampft. Mit jeweils 1 ml Tyrode-Lösung wurde der eingetrocknete Rückstand gelöst und in vorbereitete Wells (Kapitel 3.2.4.) pipettiert. Desweiteren wurden jeweils 10, 200 und 500 µl Kokoswasser aus Kokosnüssen unterschiedlicher Entwicklungsstufen (Abb. 3.1.) verwendet und in Wells pipettiert. Das Endvolumen von 1 ml wurde mit Tyrode-Lösung aufgefüllt.



Trinknuss (links): Länge ca. 30 cm, enthält 500 ml Kokoswasser; 5-10 mm festes Endosperm

Steinfrucht einer reifen Nuss (rechts): Länge ca. 15 cm, enthält 100-200 ml Kokoswasser, 10-25 mm festes Endosperm



Abb. 3.1. Darstellung zweier Entwicklungsstufen der Kokosnuss.

3.1.2.2. Extraktion mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polaritäten

Um Aufschluss über die Löslichkeit der aktiven Substanz zu erhalten, ist es sinnvoll, Extrakte des Pflanzenmaterials mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität herzustellen. Ziel dabei ist es, eine möglichst große Menge der gesuchten Komponenten zu lösen und ein Lösungsmittel zu finden, das leicht zu entfernen ist und bei späteren Bioassay-Versuchen keine störenden oder giftigen Rückstände hinterlässt. Durch ein solches Primärscreening können Rückschlüsse auf die Stoffklassenzugehörigkeit gezogen werden. Dies ist wiederum hilfreich bei der Isolierung und der späteren Analyse der gesuchten Substanz.

Zur ersten Abschätzung der Lipo-, Amphi- oder Hydrophilie des wirksamen Prinzips wurden folgende Lösungsmittel mit steigender Polarität (Abb. 3.2.) zur Extraktion verwendet:

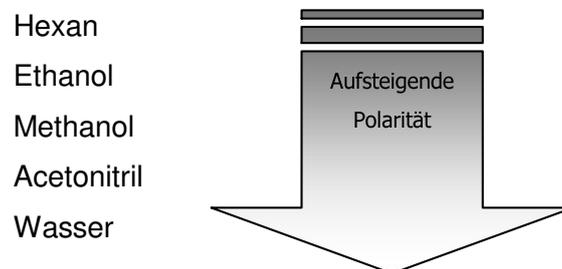


Abb. 3.2.: Zur Extraktion verwendete Lösungsmittel und deren Polarität

Für die Herstellung der Extrakte wurden je 1 g getrocknete Kokosflocken mit 10 ml des jeweiligen Lösungsmittels vermischt und über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte filtriert und bis zur Trockenheit eingedampft. Für

3. Material und Methoden

den folgenden in-vitro-Assay wurden die getrockneten Extrakte in 3 ml Tyrode-Lösung aufgenommen und davon 150 µl in kleine Mikrotiterwells mit jeweils 4-5 *Trichuris muris* Würmer beider Geschlechter überführt. Der Hexan-Ansatz wurde zusätzlich mit 15 µl Polyethylenglykol-300 als Lösungsvermittler lipophiler Substanzen versetzt. Als Kontrolllösungen diente eine Tyrode-Lösung mit Zusatz von 10% Polyethylenglykol-300 und Tyrode Lösung ohne Zusatz. Die Mikrotiterplatte wurde bei 37°C im Heizschrank inkubiert und nach bestimmten Zeiten kontrolliert.

Tab. 3.1.: Überprüfung der mit verschiedenen Lösungsmitteln hergestellten Kokos-Extrakte in einem in-vitro-Versuch mit adulten *T. muris*

Ansatz	Dosis Rohextrakt [mg/ml]
Kontrolle	-
Kontrolle + 10% PGE	-
Wasser	333,3
Hexan (C ₆ H ₁₄) + 10% PGE	333,3
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	333,3
Methanol (CH ₃ OH)	333,3
Acetonitril (C ₂ H ₃ N)	333,3

3.1.2.3. Überprüfung der Thermostabilität

Die Löslichkeit von Substanzen in einem Lösungsmittel steigt mit zunehmender Temperatur, durch zu große Hitzeeinwirkung können diese jedoch geschädigt werden. Die Thermostabilität gibt ebenfalls Hinweise auf die Verwendung geeigneter Lösungsmittel, da diese gegebenenfalls bei relativ niedrigen Temperaturen wieder entfernt werden müssen.

Zur Überprüfung der Hitzeverträglichkeit wurden 5 Ansätze mit je 1 g getrockneten Kokosflocken mit jeweils 10 ml Wasser vermischt und für 10 min bei 20, 30, 40, 60 und 96°C inkubiert. Für die anschließenden in-vitro-Versuche wurden alle Ansätze filtriert, getrocknet und in 3 ml Tyrode-Lösung aufgenommen. Davon wurden jeweils 150 µl in die mit 4-5 Nematoden bestückten Wells pipettiert.

3. Material und Methoden

Tab. 3.2.: Überprüfung der Thermostabilität der Kokos-Wasser-Extrakte mit Hilfe von in-vitro-Assays

Ansatz	Dosis Rohextrakt [mg/ml]	Entsprechende Menge Trockengewicht [g/Well]
20°C	333,3	0,05
30°C	333,3	0,05
40°C	333,3	0,05
60°C	333,3	0,05
96°C	333,3	0,05

3.1.2.4. Überprüfung von Proteinen und Peptiden auf ihre Wirksamkeit

Um eine Aktivität von Proteinen und auch Peptiden auszuschließen, die bei Hitzebehandlung oft nicht denaturiert werden, wurde ein Extrakt mit Proteinase K versetzt. Proteinase K ist sehr unspezifisch und zerschneidet Proteine in kleinste Sequenzabschnitte. Für den Test wurden 1 g Kokosflocken in 2 ml Aqua bidest. eine Stunde bei 40°C in einem Heihschrank inkubiert. Nach der Filtration wurden 180 µl in ein Eppendorfgefäß überführt, der pH-Wert mit 1M PBS auf pH 7,5-8 eingestellt, 20 µl Proteinase K-Stammlösung hinzugefügt und anschließend bei 57°C auf einem Thermomixer für 1,5 h geschüttelt. Der so inaktivierte Extrakt (200 µl) wurde mit 70 µl 0,7M PBS versetzt und in ein Well mit Nematoden überführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 0,7M PBS.

Tab. 3.3.: Überprüfung einer Aktivität von Proteinen der *Cocos nucifera* in einem Bioassay.

Ansatz	Dosis Rohextrakt [mg/ml]	Entsprechende Menge Trockengewicht [g/Well]
Kontrolle 0,7M PBS	-	-
Proteinase K-Extrakt	500	0,09

3.1.3. Isolierung und Reinigung

3.1.3.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Anhand der bei den Vorversuchen (Kap. 3.1.2.2.) gewonnenen Ergebnissen konnten erste Anhaltspunkte über die Polarität der gesuchten Substanz gewonnen werden. Für die spätere Strukturaufklärung ist es wichtig, die gesuchte Substanz von allen störenden Komponenten zu trennen. Für solche Trennungsvorgänge zählt die Flüssig-Flüssig-Extraktion zu den

3. Material und Methoden

gängigen Methoden, da sie einfach zu handhaben ist. Ein Nachteil bei dieser Art der Extraktion ist jedoch der hohe Verbrauch an organischen Lösungsmitteln. Da sich bereits bei den Extraktionsversuchen (Kap. 3.1.2.2.) zeigte, dass sich der gesuchte Wirkstoff nicht mit Hexan extrahieren lässt, können mit diesem unpolaren Lösungsmittel störende lipophile Komponenten, wie z.B. Fette, aus dem Rohextrakt herausgewaschen werden. Dazu wurden 10 g getrocknete Kokosflocken in 20 ml 90% Ethanol über Nacht auf einem Schütteltrichter bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ethanol-Rohextrakt 2x mit Hexan in einem Schütteltrichter ausgewaschen.

Das Endosperm der Kokosnuss enthält neben Fetten auch einen hohen Anteil an Polyphenolen. Nach neusten Untersuchungen von Mendonca-Filho et al. (2004) sollen die Polyphenole der Schale eine Wirkung auf Leishmanien haben. Daher galt es zu überprüfen, ob es sich bei der anthelminthisch aktiven Substanz ebenfalls um ein Polyphenol handelt oder ob diese Substanzgruppe ausgeschlossen werden kann. In diesem Fall ist die Trennung der Polyphenole vom Extrakt unerlässlich, da diese Oxidationsreaktionen (Houghton und Raman, 1998) mit vielen anderen Substanzen eingehen und diese so zerstören können. Die Polyphenolextraktion nach Wall et al. (1996) stellt eine geeignete Methode dar, um diese Substanzgruppe vom Rest zu trennen bzw. in einer Phase anzureichern. Dazu wurde der zuvor mit Hexan gereinigte Ethanol-Extrakt in einem Heizschrank bei 37°C auf etwa 2/3 seines Volumens eingedampft und anschließend im Verhältnis 1:1 mit Chloroform versetzt. Dieses Gemisch wurde wiederum mit dem gleichen Volumen Aqua bidest. vermischt. Die Chloroform- und die Wasser-Phase wurden mittels Schütteltrichter voneinander getrennt und bis zur vollständigen Trocknung eingedampft. Zur Überprüfung der Aktivität beider Phasen in in-vitro-Tests wurden diese mit 20 ml Tyrode-Lösung aufgenommen, wovon jeweils 200 µl in vorbereitete Wells (Kap. 3.2.4.) pipettiert wurde.

3. Material und Methoden

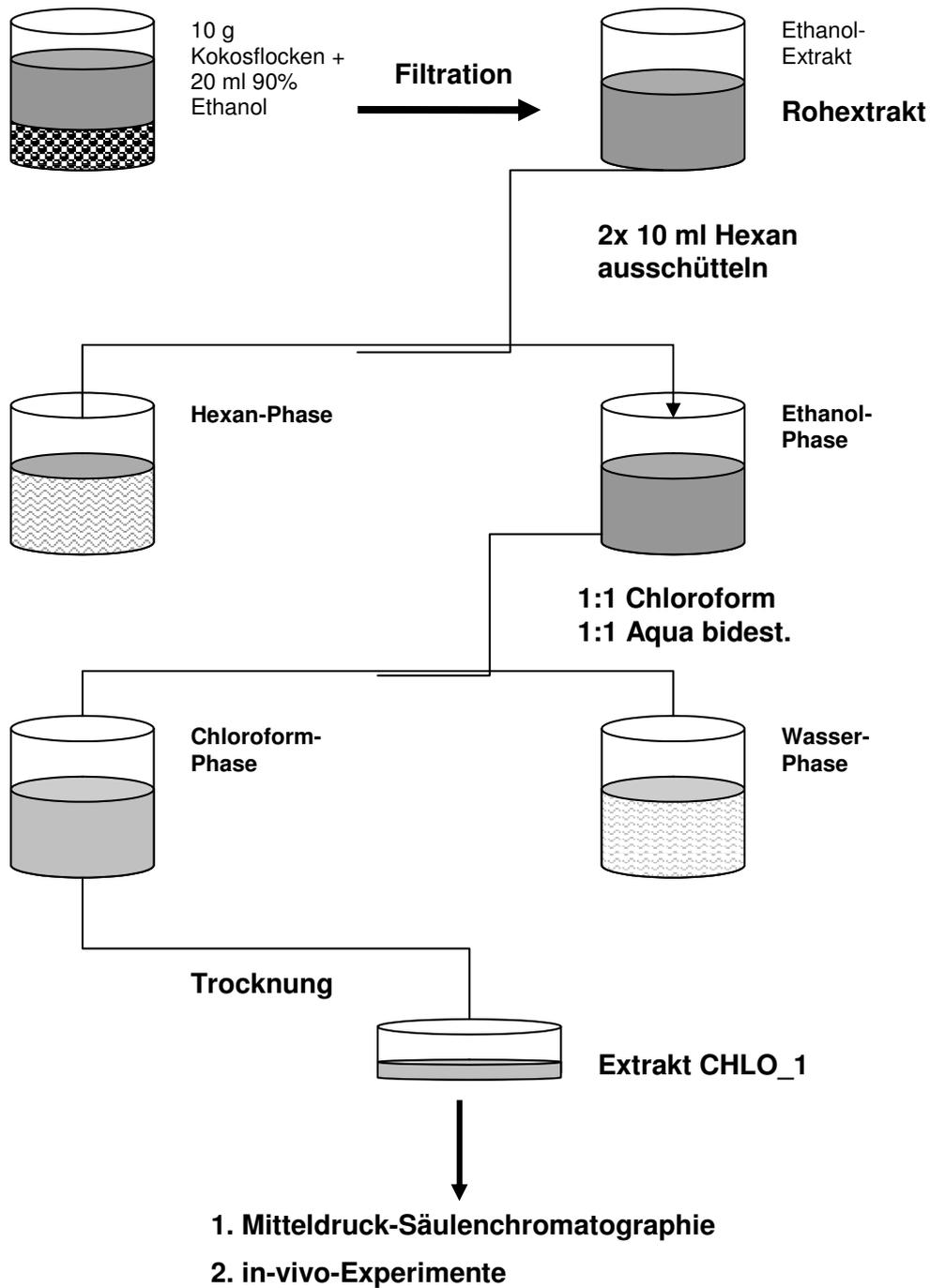


Abb. 3.3.: Extraktionsschema der Polyphenolextraktions-Methode nach Wall et al. 1996

3. Material und Methoden

Tab. 3.4.: Überprüfung der Aktivität der bei der Polyphenolextraktion angefallenen Chloroform- bzw. Wasserphase in einem in-vitro-Assay

Ansatz	Dosis [mg/ml]	Entsprechende Menge Trockengewicht [g/Well]
Kontrolle Tyrode-Lösung	-	-
Chloroform-Phase	500	0,1
Wasser-Phase	500	0,1

2.1.3.2. Auswahl eines geeigneten Fließmittels mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung von Stoffgemischen in reine Substanzen ist von zentraler Bedeutung für das chemische Arbeiten. Nur so kann die Reinheit einer Substanz oder die Zusammensetzung einer Mischung mehrerer Inhaltsstoffe analytisch bestimmt werden. Eine wichtige Technik zur analytischen und präparativen Trennung von Stoffgemischen ist die Chromatographie.

Die Dünnschichtchromatographie bietet eine schnelle und einfache Möglichkeit, in Vorversuchen ein Fließmittelsystem zu finden und zu optimieren, das bei der späteren Trennung des Extraktes mit Hilfe der Säulenchromatographie eingesetzt werden soll. In kleinsten Probeansätzen kann eine Vielzahl an Lösungsmitteln getestet werden, bis eine möglichst gute Auftrennung der im Chloroform-Extrakt vorhandenen Substanzen erfolgt. Dabei ist es erforderlich, dass die DC-Platten mit dem gleichen Grundkieselgel belegt sind wie die später verwendeten Säulen.

Die Vorversuche zur Findung einer geeigneten Extraktionsmethode zeigten, dass sich der gesuchte Wirkstoff in der Chloroform-Phase sammelt und in Wasser als auch in Ethanol löslich ist, was darauf hindeutet, dass es sich um eine mittel- bis polare Substanz handeln könnte. Die in dieser Arbeit verwendete Reversed-Phase-Säulenchromatographie (RP-SC) ist ein gängiges Verfahren zur Auftrennung von unpolaren bis polaren Substanzen. Dabei werden unpolare Stoffe später eluiert als polare. Für die Vorversuche zur Fließmittelloptimierung wurden RP-DC-Platten (Fa. Machery-Nagel) verwendet.

Ein einfaches Modell zur Findung eines geeigneten Fließmittels ist das Optimierungsschema der Firma CAMAG (Reich und George 1997). Dabei wurde zunächst eine Reihe von reinen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität getestet, die später miteinander kombiniert wurden. Ziel dieser Arbeit war eine möglichst gute Auftrennung der einzelnen Substanzen in einen unteren, mittleren und oberen Bereich der DC-Platte.

3. Material und Methoden

Mit einer über einer Flamme dünn ausgezogenen Glaspipette wurde der in Methanol aufgenommene Chloroform-Extrakt punktförmig auf 2 x 8 cm große DC-Platten (Alugram RP-18W/UV₂₅₄, 0,15 mm Kieselgel, 4 x 8 cm, Firma Macherey-Nagel) aufgetragen und jeweils mit Chloroform, Methanol, Ethanol, Wasser und Diethyläther eluiert. Alle DC-Platten wurden bei Kammerfüllung über eine Laufstrecke von ca. 6 cm entwickelt. Die Auswertung der Platten erfolgte zunächst visuell, anschließend durch Detektion unter UV-Licht bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung) sowie bei 366 nm (Eigenfluoreszenz).

3.1.3.3. Mitteldruck-Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde von W. Clark Still und Mitarbeitern 1987 an der Columbia University, New York, entwickelt. Das Hauptanwendungsgebiet der SC liegt in der Aufreinigung organischer Substanzgemische. Die in dieser Arbeit verwendeten Flash-Chromatographiesäulen (Chromabond C18 Hydra 6 ml/2000 mg; Firma Macherey-Nagel), waren mit reversed-phase (Octadecyl-) modifiziertem Kieselgel mit einer Partikelgröße von 45 µm gefüllt. Durch die geringe Partikelgröße und durch Anlegen von Druck wurde eine bessere und schnellere Trennleistung als bei konventionell verwendeten Säulen erzielt.

Bei den DC-Vorversuchen (Kap. 3.1.3.2.) zur Etablierung eines Fließmittels wurde mit einem Elutionsgemisch von 4 : 1 Ethanol-Wasser (Kap. 4.2.4.2.) eine möglichst großflächige Trennung der einzelnen Substanzen erzielt. Für die Trennung des Chloroformextraktes, im Weiteren als Extrakt CHLO_1 bezeichnet, wurden die Flash-Chromatographiesäulen über einen dünnen 23 cm langen Plastikschlauch (Ø 1 mm) mit einer peristaltischen Pumpe (Firma Bio-Rad) verbunden. Die Fraktionen wurden manuell in 1,5 ml großen, nummerierten Eppendorf-Gefäßen aufgefangen.

Säule: Chromabond C18 (Fa. Macherey&Nagel)

Konditionierung: 20 ml 4:1 Ethanol/Wasser

Probenaufgabe: 100 µl CHLO_1 in Ethanol (≈55 µg)

Elution: 10 ml 4:1 Ethanol/Wasser

Elutionsgeschwindigkeit: 0,3 ml/min

Pumpe: Econo-Column Pump, Fa. Bio-Rad

Fraktionen: Fraktion 1= 0,75 ml; Fraktion 2= 0,5 ml, Fraktion 3-14= 0,1 ml

Alle aufgefangenen Fraktionen 1-14 wurden eingedampft, mit 150 µl Tyrode-Lösung eluiert und in einem in-vitro-Assay (Kap. 3.2.4.) an *T. muris*-Nematoden auf eine Aktivität hin getestet.

Tab. 3.5.: In-vitro-Assay mit den bei der Mitteldruck-Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen 1-14

Fraktion Nr.	mg/Well
1	0
2	0,5
3	0,5
4	0,5
5	0,5
6	0,5
7	0,5
8	0,5
9	0,5
10	0,5
11	0,5
12	0,5
13	0,5
14	0,5

3.1.3.4. Präparative Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie eignet sich nicht nur für analytische sondern auch für präparative Zwecke. Hierzu wurde die mit Hilfe der Säulenchromatographie vorgetrennten, in Bioassays als aktiv bestimmten Fraktionen 4-6 (Kap. 4.2.4.3.; Tab. 4.6.) strichförmig mit einer feinen Glaskapillare auf DC-Platten (20 x 20 cm Kieselgel 60 F254, Firma Merck) aufgetragen und zunächst mit einem Lösungsmittelgemisch aus 4:2 Chloroform/Ethanol entwickelt. Alle Platten wurden bei Kammersättigung über eine Laufstrecke von ca. 8 cm entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht mit den Wellenlängen 254 nm und 366 nm. Die zunächst im oberen Plattendrittel detektierten Banden (Kap. 4.2.4.4.; Abb. 4.2.) wurden von oben nach unten nummeriert (B1-B7), mit einem dünnen, feinen Spatel einzeln abgekratzt und in gekennzeichnete Eppendorf-Gefäße überführt. Die erneute Elution erfolgte mit 100% Methanol bei 40 °C in einem Thermomixer (Fa. Eppendorff). Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, eingedampft und die Aktivität in einem Bioassay an *Trichuris muris* getestet.

3. Material und Methoden

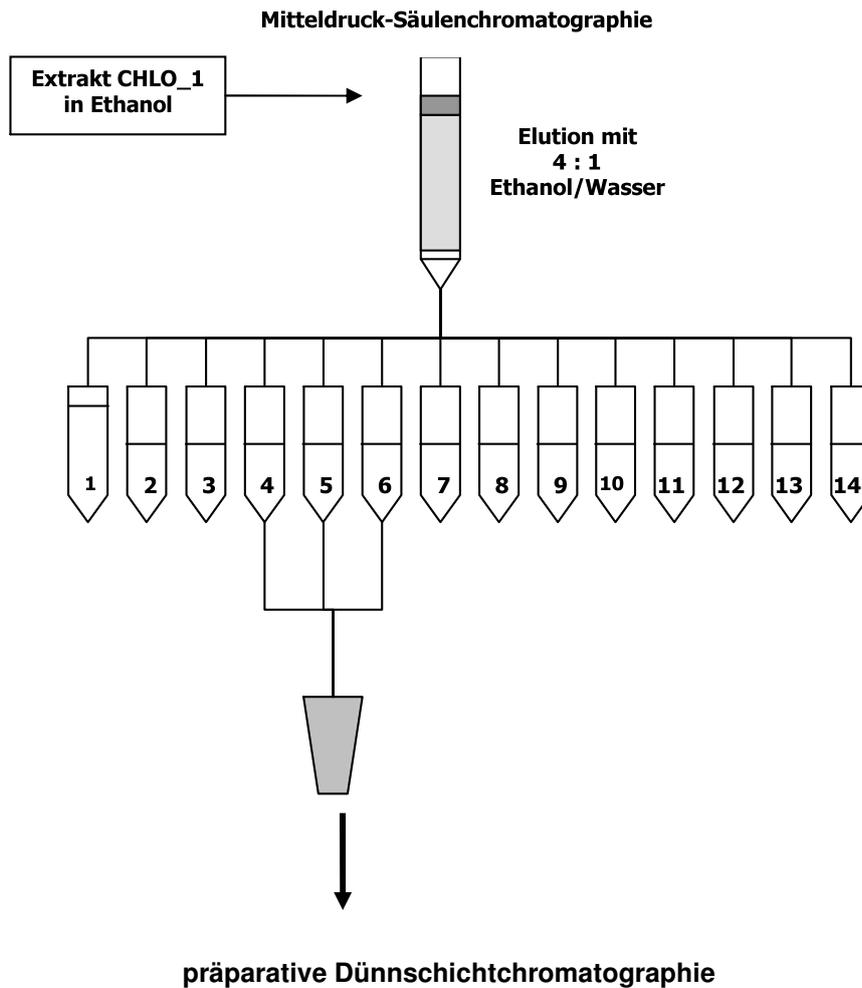


Abb. 3.4.: Auftrennungsschema des Extrakts CHLO₁ mit Hilfe der Mitteldruck-Säulenchromatographie und der präparativen Dünnschichtchromatographie

Tab. 3.6.: In-vitro-Assay mit den bei der präparativen Dünnschichtchromatographie detektierten Banden B1-B7

Bande Nr.	mg/Well
B1	0,2
B2	0,25
B3	0,3
B4	0,2
B5	0,2
B6	0,3
B7	0,25

Für die weitere Reinigung der als aktiv bestimmten Bande B2 sollte das Fließmittelsystem erneut abgestimmt werden. Dazu wurde die Probe in Methanol gelöst, auf DC-Platten

3. Material und Methoden

aufgetragen und mit den Lösungsmitteln Toluol, Aceton und Essigsäureethylester entwickelt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm sowie durch Besprühen mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Alle auf diese Weise detektierten Banden (x1-x5) (Kap. 4.2.4.4.; Abb. 4.4.) wurden wiederum abgekratzt, eluiert, eingedampft und auf ihre Aktivität hin in einem Bioassay getestet.

Tab. 3.7.: In-vitro-Assay mit den bei der präparativen Dünnschichtchromatographie detektierten Banden x1-x5

Bande Nr.	g/Well
X1	0,2
X2	0,19
X3	0,18
X4	0,2
X5	0,19

3.1.4. Spektroskopische Methoden

Die wichtigsten Mittel zur Strukturbestimmung von organischen Molekülen sind spektroskopische Methoden. Bei allen spektroskopischen Messungen werden Veränderungen der Moleküleigenschaften, wie etwa die Anregung von Schwingungen oder Elektronen, die durch Wechselwirkungen mit elektromagnetischen Strahlen entstehen, registriert. Durch den spezifischen Aufbau der einzelnen Moleküle lässt sich die Struktur mit Hilfe dieser Messmethoden ermitteln.

3.1.4.1. Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie

Bei dieser modernen Methode zur Bestimmung der Molmassen von Verbindungen liegt der Vorteil in der sehr geringen Probenmenge von nur einem 1 µg, die für eine Strukturaufklärung benötigt wird. Voraussetzung für die Gaschromatographie ist die Verdampfbarkeit der zu untersuchenden Substanz.

Das Verfahren der Gaschromatographie beruht auf demselben Trennprinzip wie bei der in Kap. 3.1.3.3. angesprochenen Säulenchromatographie. Als mobile Phase dient hier ein Trägergas, meist Wasserstoff, als stationäre Phase ein mit Polyimid beschichteter Quarzsand. Die Probe wird mit Hilfe einer Spritze in einen Injektorblock eingespritzt und dort unmittelbar verdampft. Die verschiedenen Verbindungen der Probe werden unterschiedlich stark von der Säule zurückgehalten und dabei aufgetrennt. Die anschließende

3. Material und Methoden

Massenspektroskopie (MS) ist eine der wichtigsten Methoden in der analytischen Chemie zur Aufklärung der Struktur und Zusammensetzung von Verbindungen und Gemischen. Mithilfe der MS können Massenfragmente und Molmassen der Verbindungen bestimmt werden, was die Auswertung der bei der NMR-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse vereinfacht.

Die Analyse der Probe X4 wurde am Institut für Analytische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf an einer GC-MS Apparatur durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der „mainlib“-Datenbank ausgewertet.

3.1.4.2. NMR-Spektroskopie = Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Die NMR-Spektroskopie eignet sich besonders gut zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen. Das Prinzip beruht auf der Resonanz-Wechselwirkung zwischen einem hochfrequenten, magnetischen Wechselfeld und bestimmten Atomkernen der zu untersuchenden Probe (fest, flüssig), die sich in einem starken, homogenen, äußeren Magnetfeld befindet. Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie ist allerdings der relativ große Probenbedarf von 2-5 mg der reinen Substanz. Für die NMR-Spektroskopie wurden insgesamt 5 mg der reinen Probe (Bande x4) isoliert und am Institut für Biologische Pharmazie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf analysiert.

3.2. Parasitologische Methoden

3.2.1. Stammhaltung und Infektion der Versuchstiere

3.2.1.1. *Trichuris muris*

Gerbils (*Meriones unguiculatus*) haben sich als geeignete Endwirte für *T. muris* erwiesen (Strassen et al. unveröffentlicht). Der Kot infizierter Tiere wurde gesammelt, durch feine Gaze filtriert, mehrmals gewaschen und in großen Zentrifugenröhrchen mit reichlich Wasser im Brutschrank bei 28 °C zur „Reife“ gebracht. Die Entwicklung einer infektiösen Larve im Ei dauert ca. 60 Tage. Den Versuchstieren wurden jeweils 200 infektiöse (= larvenhaltige) Eier per Zungensonde verabreicht.

3.2.1.2. *Angiostrongylus cantonensis*

Der Kot infizierter Wistar-Ratten wurde in Wasser aufgeschwemmt, und die kleinen, durchsichtigen Larven wurden vorsichtig mit Hilfe einer Glaspipette separiert. 500-800 Larven wurden zusammen mit jeweils einer *Biomphalaria*-Schnecke in ein Schnappdeckelglas mit 3 ml Aquarienwasser verbracht und für max. 48 Stunden inkubiert. Die infizierten Schnecken verblieben für ca. 42 Tage bei 25-26°C in 20 l Plastikaquarien. Nach dieser Zeit wurden die infektionsfähigen, voll beweglichen Larven L3 in 0,9%iger Kochsalzlösung aus den Schnecken präpariert. Die Neuinfektion der 150-200 g schweren Wistar-Ratten erfolgte mit 40 Larven. Die Larven wandern zunächst ins Gehirn, sind aber ab Tag 21 p.i. in den Blutgefäßen der Lunge anzutreffen. Die Adultwürmer im Lungenbereich produzieren dann ab Tag 44 p.i. nach der Infektion erneut Larven, die mit dem Kot ausgeschieden werden.

3.2.1.3. *Toxocara cati*

Hier wurde eine private Hauskatze (Alter 4 Jahre), die natürlich mit *Toxocara cati* infiziert war, eingesetzt. Der Kot dieser Katze wurde auf Eier hin untersucht und die Eizahl pro Gramm Fäzes zu Beginn der Behandlung bestimmt.

3.2.1.4. *Hymenolepis microstoma*

Der Kot von infizierten Balb/C Mäusen wurde gesammelt und zu einem feuchten Brei aufbereitet, mit dem ein Plastikkäfig ausgestrichen wurde, in dem sich Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*) befanden. Die infizierten Käfer wurden nach 14 Tagen präpariert und die in ihnen enthaltenen Cysticercoide-Larven vorsichtig in 0,9%iger NaCl-Lösung gesammelt. Die Neuinfektion der Mäuse erfolgte mit 15 derartiger Cysticercoide-Larven oral per Zungensonde.

3.2.1.5. *Hymenolepis diminuta*

Für die Erstinfektion wurden zunächst Cysticercoide aus Reiskäfern (*Sitophilus oryzae*) aus dem Institut für Parasitologie der Universität Stuttgart verwendet. Als Versuchstiere dienten Wistar-Ratten mit einem Anfangsgewicht von ca. 150 g, die mit jeweils 3 Cysticercoiden oral per Zungensonde infiziert wurden. Für die Stammhaltung im eigenen Labor wurde der Kot

der infizierten Ratten gesammelt, mit Wasser zu einem feuchten Brei vermengt und in kleinen Plastikkäfigen ausgestrichen. Als Zwischenwirte fungierten Mehlkäfer (wie bereits bei *H. microstoma* beschrieben).

3.2.1.6. *Taenia taeniaeformis*

Als Versuchstiere dienten zwei natürlich mit *Taenia taeniaeformis* infizierte, private Hauskatzen (Alter zwischen 2-4). Der Kot der Katzen wurde auf Bandwurmeier, die Analregion auf Proglottiden hin untersucht.

3.2.1.7. *Echinostoma caproni*

Balb/C Mäuse wurden mit den aus *Biomphalaria*-Schnecken gewonnenen Metacercarien (etwa 20 – 25 Stück/Maus) oral per Zungensonde infiziert. Nach frühestens 15 Tagen wurden die mit den Fäzes ausgeschiedenen, gedeckelten Eier gesammelt, gewaschen und durch feine Gaze filtriert. Die gereinigten Eier wurden in großen Gefäßen gesammelt und mit viel Wasser offen für mindestens 19 (max. 25-30) Tage bei Zimmertemperatur im Dunkeln zur Reife gebracht. Durch Licht- und Temperaturerhöhung von 3°C wurden die Miracidien nach etwa 30 min zum Schlüpfen gebracht. Mit einer feinen Pipette wurden 8-10 Miracidien in kleine Wells überführt, in die ebenfalls 10-Cent-große, zuvor gewaschene Schnecken (*Biomphalaria glabrata*) eingesetzt wurden. In den Herzbeuteln der Schnecken entwickelten sich nach 4-6 Wochen Metacercarien, die für Neuinfektionen verwendet wurden.

3.2.1.8. *Fasciola hepatica*

Die Infektion der ca. 150 g schweren Wistar-Ratten erfolgte mit 12 Metacercarien oral per Schlundsonde. Das Infektionsmaterial wurde vom Parasitologischen Institut der Universität Limoges (Frankreich) zur Verfügung gestellt. Nach etwa 70 Tagen wurde der Kot der Tiere auf Eier hin untersucht.

3.2.1.9. *Eimeria papillata*

Der Kot infizierter Balb/C Mäuse wurde gesammelt, mit einer Saccharose/Kochsalz-Flotationslösung gewaschen und anschließend bei Zimmertemperatur in ca. 7 Tagen zur Sporulation gebracht. Die Aufbewahrung erfolgte in einer ca. 2% Kaliumbichromatlösung, die

vor der oralen Applikation durch mehrmaliges Waschen entfernt wurde. Die Neuinfektion der Mäuse erfolgte oral per Schlundsonde mit 40.000 sporulierten Oocysten.

3.2.1.10. *Trichomonas muris*

Alle in dieser Arbeit als Versuchstiere dienenden Gerbils (*Meriones unguiculatus*) waren bereits natürlich mit Trichomonaden vorinfiziert.

3.2.2. Bestimmung des Infektionsgrads der Versuchstiere

Es wurde stets frischer Kot der Versuchstiere gesammelt, ausgewogen und mit einer bestimmten Menge Wasser gut mit einem Spatel vermischt. Anschließend wurde eine festgelegte Menge dieses Kot-Wassergemischs mit einer Pipette entnommen und auf einen Objektträger kreisförmig aufgetragen. Bei Tieren, die mit Trematoden, Cestoden oder Nematoden infiziert waren, wurde die Eizahl unter dem Mikroskop ausgezählt und die Eizahl/g Fäzes berechnet. Bei den mit *Taenia taeniaeformis* infizierten Katzen wurden die Versuchsergebnisse zusätzlich anhand von Auftreten bzw. Nichtauftreten von Proglottiden am After der Tiere oder in deren Kot bewertet. Bei den mit *Angiostrongylus cantonensis* infizierten Ratten wurden die mit dem Kot ausgeschiedenen L1-Larven/pro g Fäzes mikroskopisch bestimmt. Die Anzahl der Parasitenstadien im Kot der mit *Eimeria papillata* und Trichomonaden infizierten Versuchstiere wurden ebenfalls unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

3.2.3. Bestimmung der Wurmlast

Versuchstiere, die mit Cestoden (*H. microstoma*, *H. diminuta*), Trematoden (*E. caproni*) oder Nematoden (*T. muris*, *A. cantonensis*) infiziert waren, wurden zum Versuchsende hin mit CO₂ getötet, der gesamte Darm bzw. die Gallenblase und die Gallengänge herauspräpariert, der Länge nach aufgeschnitten und die Parasitenstadien gezählt.

3.2.4. Etablierung eines Bioassays

Auf der Suche nach geeigneten Methoden zur Isolierung des pharmakologisch aktiven Wirkstoffs spielen Bioassays meist eine bedeutende Rolle. Dabei werden in möglichst einfachen Testsystemen alle Extrakt-Typen und Fraktionen auf ihre Aktivität hin getestet.

3. Material und Methoden

Eine vorhandene bzw. nichtvorhandene Aktivität gibt Rückschlüsse auf nachfolgende, mögliche Isolationsschritte. Bioassays sind in sofern den In-vivo-Tests vorzuziehen, da sie Tierversuche vermeiden und dazu auf einfache Art und Weise eine große Anzahl an Proben untersucht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Tabelle (Tab. 3.8.) aufgeführten Testsysteme auf ihre Sensibilität hin untersucht.

Als Testorganismen dienten zum einen die Redien der Trematodenart *E. caproni*, die aus infizierten *Biomphalaria*-Schnecken herauspräpariert wurden. Als Inkubationsmedium für die Redien diente 0,7 M PBS. Als weitere Spezies wurden die L1-Larven der Nematodenart *Angiostrongylus cantonensis* verwendet. Dieser Testorganismus ist äußerst leicht zu beschaffen, da die Larven mit dem Kot der infizierten Wistar-Ratten ausgeschieden werden. Die gesäuberten Larven wurden in Tyrode-Lösung als Inkubationsmedium verbracht. Desweiteren wurden aus mit *Trichuris muris* infizierten Gerbils die Adultnematoden herauspräpariert und in Tyrode-Lösung inkubiert. Alle Testorganismen wurden in kleine Wells auf Mikrotiterplatten verbracht und mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen eines Kokos-Extraktes, hergestellt aus 1 g Kokosflocken in 10 ml Wasser, behandelt. Dazu wurde der Extrakt filtriert und eingedampft und in den entsprechenden Inkubationsmedien aufgenommen. Als Kontrolle wurde stets jede Parasitenart in dem reinen Inkubationsmedium gehalten. Mikrotiterplatten mit *T. muris* als Testspezies wurden in einem Heizschrank bei 37°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten T= 0 bis T = 24 h wurde der Status der Testorganismen unter dem Mikroskop bzw. unter dem Binokular kontrolliert.

Tab. 3.8.: Überprüfung einer in-vitro-Sensibilität verschiedener Testorganismen auf unterschiedliche Konzentrationen eines Kokosextraktes

Testorganismus	Medium	Kokos-Extrakt [g Flocken/ml]		
Redien (<i>E. caproni</i>)	0,7 M PBS	0,005	0,01	0,1
L1-Larven (<i>A. cantonensis</i>)	Tyrode- Lösung	0,005	0,01	0,1
Adultnematoden (<i>T. muris</i>)	Tyrode- Lösung	0,005	0,01	0,1

3.2.5. In-vivo-Behandlungsversuche bei mit *T. muris* infizierten Gerbils (Pharmakologische Methoden)

Einige in den unter Kapiteln 3.1.2. bis 3.1.3. in einem Bioassay getesteten Extrakte bzw. Fraktionen sollten als Bestätigung einer vorhandenen Aktivität auch in einem in-vivo-

3. Material und Methoden

Behandlungsversuch am Testparasiten *T. muris* überprüft werden. Dies ist unerlässlich, da eine im Bioassay-Versuch beobachtete Aktivität nicht unbedingt auf einen komplexen Tierorganismus übertragbar ist.

3.2.5.1. Überprüfung der Hitzestabilität des Wirkstoffs

Um die in den in-vitro-Tests gewonnenen Ergebnisse (Kap. 4.2.2.) über die Hitzestabilität auch am Tierorganismus bestätigen zu können, wurde Gerbil Nr. 2 mit einem auf 96°C erhitztem Kokos-Wasser-Extrakt mit einer Dosis von 32 g Kokosflocken/kg KGW Gerbil an den Tagen 49 und 50 p.i. behandelt. Dazu wurden 100 g getrocknete Kokosflocken in 200 ml Aqua bidest. in einem Heizschrank auf 96°C erhitzt und anschließend die entsprechende Menge dem Versuchstier oral per Sonde in den Mund appliziert. Gerbil Nr. 1 erhielt keinerlei Behandlung und diente als Infektionskontrolle. Die Sektion beider Versuchstiere wurde am Tag 54 p.i. durchgeführt.

Tab. 3.9.: 2malige Behandlung mit auf 96°C erhitztem Kokos-Wasser-Extrakt an den Tagen 49 und 50 p.i.

Gerbil Nr.	Dosis Trockengewicht [g/kg KGW Gerbil] pro Tag
1	Infektionskontrolle
2	32

3.2.5.2. Überprüfung der Wirksamkeit der Hexan- und Ethanolphase

Für die Überprüfung der im Versuch (Kap. 4.2.1.) gewonnen in-vitro-Ergebnisse wurde der infizierte Gerbil Nr. 2 mit 0,25 g der bei der Extraktion angefallenen Hexanphase behandelt, das Versuchstier Nr. 3 erhielt 0,15 g der Ethanolphase pro Tag. Beiden Tieren wurde der Extrakt an zwei aufeinander folgenden Tagen (Tag 49 und 50 p.i.) per Schlundsonde oral mit etwas Wasser bzw. die Hexanphase mit einem 10%igen Polyethylenglykol-Wassergemisch verabreicht. Tier Nr.1 diente als Infektionskontrolle und wurde nicht behandelt. An den Tagen 45-52 p.i. wurde der Kot der Gerbils auf Eier hin untersucht und die Eizahl/g Fäzes bestimmt. Am Tag 52 p.i. wurden alle Tiere seziiert und der gesamte Darm auf Würmer hin kontrolliert.

3. Material und Methoden

Tab. 3.10.: 2malige Behandlung mit der bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion angefallenen Hexan- und Ethanolphase an den Tagen 49 und 50 p.i.

Gerbil Nr.	Dosis [g/kg KGW Gerbil] pro Tag	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW Gerbil] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	0,25	70
3	0,15	70

3.2.5.3. Überprüfung der Wirksamkeit der Chloroform- und Wasserphase aus der Polyphenolextraktion

Bei diesem Experiment wurde Gerbil Nr. 2 mit der Chloroformphase und Gerbil Nr. 3 mit der Wasserphase behandelt. Beide Versuchstiere erhielten an den Tagen 48 und 51 p.i. jeweils eine Dosis von 1,0 g Chloroformphase und 1,4 g Wasserphase/kg KGW Gerbil oral per Sonde. Versuchstier Nr. 1 diente als Infektionskontrolle. An den Tagen 45-48 und 51-53 p.i. wurde der Kot der Gerbils auf Eier hin untersucht und die Eizahl/g Fäzes bestimmt. Bei der Sektion am Tag 53 p.i. wurde die Anzahl der im Caecum aufgefundenen Nematoden dokumentiert.

Tab. 3.11.: 2malige Behandlung mit der bei der Polyphenolextraktion angefallenen Chloroform- und Wasserphase an den Tagen 48 und 51 p.i.

Gerbil Nr.	Dosis [g/kg KGW Gerbil] pro Tag	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW Gerbil] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	1,0	260
3	1,4	260

3.2.5.4. Überprüfung der Wirksamkeit der bei der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen 4-6 und 8-14

Die Wirkung der in den in-vitro-Experimenten aktiven Fraktionen 4-6 sollte auch auf das Tiermodell übertragbar sein. Dazu wurde ein mit *T. muris* infizierter Versuchsgerbil Nr. 2 mit insgesamt 4 mg der Fraktionen 4-6 am Tag 48 p.i. behandelt. Ein weiteres Versuchstier wurde mit insgesamt 7 mg der als unwirksam getesteten Fraktionen 8-14 ebenfalls am Tag 48 p.i.

3. Material und Methoden

behandelt. Als Infektionskontrolle diente Tier Nr. 1, das unbehandelt blieb. Die Sektion der Versuchstiere wurde am Tag 50 p.i. durchgeführt und die im Caecum angetroffenen Nematoden gezählt.

Tab. 3.12.: 1malige Behandlung am Tag 48 p.i. mit den bei der Säulenchromatographie angefallenen Fraktionen 4-6 (Tier Nr. 2) und 8-14 (Tier Nr. 3)

Gerbil Nr.	Behandlung Tag 48 p.i.	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW Gerbil]
1	Infektionskontrolle	-
2	4 mg Fraktion 4-6	80
3	7 mg Fraktion 8-14	80

3.2.5.5. Dosis-Wirkungsbeziehung

Um eine konzentrationsabhängige Wirkung des Kokosextraktes auf mit *Trichuris muris* infizierte Gerbils zu zeigen, wurden insgesamt 28 Versuchstiere gleichen Infektionsstatus mit unterschiedlichen Konzentrationen des Extraktes CHLO-1 behandelt. Alle Versuchstiere wurden zuvor mit jeweils 200 *T. muris*-Eiern oral infiziert. 5 Tiere aus der Versuchsgruppe Nr. 1 dienten als Infektionskontrolle und erhielten keinerlei Behandlung, die restlichen Tiere wurden in 4 Gruppen à 5 Tieren und eine Gruppe à 3 Tiere zusammengestellt. Jedes Tier dieser Versuchsgruppen erhielt am Tag 52 p.i. 1x oral per Schlundsonde folgende Behandlungsdosen des Extraktes CHLO_1 (Gruppe 2 = 0,2 g/kg KGW, Gruppe 3 = 0,4 g/kg KGW, Gruppe 4 = 2 g/kg KGW, Gruppe 5 = 4 g/kg KGW, Gruppe 6 = 6 g/kg KGW). An den Tagen 53 p.i. und 54 p.i. wurden von allen 6 Gruppen Kotproben entnommen und die Eizahl/g Fäzes bestimmt. Am Tag 54 p.i. wurde exakt 48 h nach der Behandlung die Sektion der Versuchstiere durchgeführt und die Anzahl der im Caecum und Darm angetroffenen Nematoden bestimmt. Dazu wurden die Nematoden direkt nach der Eröffnung der Versuchstiere vorsichtig mit einer Federpinzette aus dem Epithel der Mukosa herausgezogen. Der Grad der äußerlich sichtbaren Schädigungen der angetroffenen Nematoden erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Schließlich wurden alle Würmer in 3% Glutaraldehyd fixiert und zur weiteren Untersuchung in Semi- und Ultradünnschnitten (Kap. 4.8.) eingebettet.

3. Material und Methoden

Tab. 3.13.: Behandlungsschema zur Darstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung bei mit *T. muris* infizierten Gerbils. Die Versuchstiere wurden 1mal am Tag 52 p.i. mit unterschiedlichen Dosen des Extraktes CHLO_1 behandelt.

Versuchsgruppe	Gerbil Nr.	Dosis Extrakt CHLO_1 [g/kg KGW]	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW]
1	1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
	2		
	3		
	4		
	5		
2	6	0,2	32
	7		
	8		
	9		
3	10	0,4	64
	11		
	12		
	13		
	14		
4	15	2,0	320
	16		
	17		
	18		
	19		
5	20	4,0	640
	21		
	22		
	23		
	24		
6	25	6,0	940
	26		
	27		
	28		

3.2.5.6. Überprüfung der Wirksamkeit von α -Monolaurin in-vitro

Als Vorversuch wurde zunächst die Aktivität von α -Monolaurin (MONOMULS® 90-L 12, CAS-142-18-7, Care Chemicals) auf die Nematoden *T. muris* in einem in-vitro-Assay getestet. Dazu wurden die Würmer mit einer Konzentration von 1 mg α -Monolaurin/Well über mehrere Stunden inkubiert und das Verhalten beobachtet.

Tab. 3.14.: In-vitro-Assay mit α -Monolaurin

Ansatz	Dosis mg/Well
Kontrolle	0
α -Monolaurin	1,0

3.2.5.7. Überprüfung der Wirksamkeit von α -Monolaurin in-vivo

Die bei der GC/MS als α -Monolaurin bestimmte C12-Fettsäure wurde ebenfalls an mit *T. muris* infizierten Gerbils getestet. Dazu wurde das Versuchstier Nr. 2 am Tag 47 p.i. mit einer Dosis von 1,6 g reinem α -Monolaurin/kg KGW Gerbil (MONOMULS® 90-L 12, Care Chemicals) behandelt, ein zweites Tier (Nr. 3) mit der 10-fach höheren Dosis von 16 g/kg KGW Gerbil. Als Kontrolle diente der unbehandelte Versuchsgerbil Nr. 1. An den Tagen 46, 47 und 50-53 wurde der Kot der Versuchstiere auf Eier hin untersucht. Die Sektion der Versuchstiere erfolgte am Tag 53 p.i.

Tab. 3.15.: 1malige Behandlung am Tag 47 p.i. mit unterschiedlichen Dosierungen von α -Monolaurin (MONOMULS 90-L 12)

Gerbil Nr.	Dosis α -Monolaurin [g/kg KGW]
1	Infektionskontrolle
2	1,6
3	16

3.2.5.8. Überprüfung der Wirksamkeit von o-Hydroxybiphenyl in-vitro

Um eine vorhandene Aktivität zunächst im Bioassay zu bestätigen, wurden die Nematoden in 1 mg o-Hydroxybiphenyl/Well des im Allgemeinen als Bakterizid oder Fungizid bekannten o-Hydroxybiphenyl (CAS-90-43-7, Sigma-Aldrich) (BPI, 1999) über mehrere Stunden inkubiert und deren Verhalten beobachtet.

Tab. 3.16.: In-vitro-Assay mit o-Hydroxybiphenyl

Ansatz	Dosis mg/Well
Kontrolle	0
o-Hydroxybiphenyl	1,0

3.2.5.9. Überprüfung der Wirksamkeit von o-Hydroxybiphenyl in-vivo

Für die Überprüfung der Aktivität in einem Tierversuch wurde ein Versuchsgerbil Nr. 2 am Tag 47 p.i. mit einer einmaligen Gabe von 0,16 mg o-Hydroxybiphenyl/kg KGW behandelt.

3. Material und Methoden

Als Kontrolltier diente dasselbe Versuchstier wie unter Kap. 3.2.5.6. beschrieben. Die Sektion beider Versuchstiere erfolgte am Tag. 53 p.i.

Tab. 3.17.: 1malige Behandlung am Tag 47 p.i. mit o-Hydroxybiphenyl

Gerbil Nr.	Dosis o-Hydroxybiphenyl [g/kg KGW]
1	Infektionskontrolle
2	0,16

3.2.5.10. Überprüfung der Wirksamkeit des Extrakts CHLO_1 auf die Larven der Nematodenart *T. muris*

Eine Besonderheit von *T. muris* stellt die intrazelluläre Larvalentwicklung im Wirtstier dar. Die Larven dieser Nematodenart wandern bereits wenige Stunden nach der Infektion in das Caecumepithel ein und verlassen dieses nach etwa 4-5 Tagen (Panesar, 1981; Hüttemann, 2004). Von da an ist nur der vordere Kopfbereich in das Epithel eingebettet. Zur Überprüfung einer Wirksamkeit auf die im Epithel liegenden Larven wurden 2 Versuchstiere (Gerbil Nr. 2 und 3) am Tag 3 p.i. mit einer Dosis von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil behandelt (Tab. 3.14.). Der Behandlungserfolg wurde anhand von Kotproben an den Tagen 45, 47 und 49 p.i. und durch Auszählen der Nematoden bei der am Tag 50 p.i. durchgeführten Sektion bemessen. Als Vergleich diente das unbehandelte Kontrolltier Nr. 1.

Tab. 3.18.: Behandlung zweier Gerbils Nr. 2 und 3 mit einer Dosis von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil am Tag 3 p.i. Tier Nr. 1 diente als Infektionskontrolle

Gerbil Nr.	Dosis [g/kg KGW Gerbil] pro Tag	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW Gerbil] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	6,0	940
3	6,0	940

3.3. In-vivo-Behandlungsversuche von anderen Parasitenspezies

3.3.1. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *H. microstoma* infizierten NMRI-Mäusen

Es wurden 6 Gruppen zu je zwei Versuchstieren (Gewicht 25 g \pm 2 g) mit unterschiedlichen Dosen des Extrakts CHLO_1 behandelt. Hierzu fanden Konzentrationen von 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 0,4 g CHLO_1/kg KGW Maus Verwendung. Die zwei Tiere der Versuchsgruppe Nr. 1 dienten als Infektionskontrolle und blieben unbehandelt. Die Mäuse Nr. 3-12 wurden einmalig am Tag 25 p.i. mit der entsprechenden Menge CHLO_1, gelöst in 10% Polyethylenglycol mit Wasser, per Zungensonde oral behandelt und nach 48 h sektioniert. Zur Überprüfung des Behandlungserfolgs wurde der Gallengang und der Darm der Versuchsmäuse vorsichtig eröffnet, die vorhandenen Cestoden herauspräpariert und anschließend gezählt.

Tab. 3.19.: Behandlungsschema zur Überprüfung einer Aktivität des Extrakts CHLO_1 auf *H. microstoma*

Versuchsgruppe	Maus Nr.	Dosis CHLO_1 [g /kg KGW Maus]	entsprechende Menge Trockengewicht [g/kg KGW Maus]
1	1 2	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	3 4	0,01	1,6
3	5 6	0,02	3,2
4	7 8	0,1	16
5	9 10	0,2	32
6	11 12	0,4	64

3.3.2. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *Hymenolepis diminuta* infizierten Wistar-Ratten

Aufgrund der im *H. microstoma*-Experiment gewonnenen Erkenntnisse (Kap. 4.6.1.), wurde eine Cestodenart gewählt, die ausschließlich im Darm des Wirtstieres parasitiert. Eine mit *H. microstoma* verwandte und vergleichbare Bandwurmart stellt *H. diminuta* dar, die relativ leicht in Wistar-Ratten als Wirtstiere gehalten werden kann. Dazu wurden insgesamt 8 Versuchstiere in 4 Gruppen zu je zwei Ratten an den Tagen 23, 25 und 27 p.i. mit unterschiedlichen Konzentrationen des Extrakts CHLO_1 behandelt. Die Tiere der Versuchsgruppe 1 erhielten keine Behandlung und dienten als Infektionskontrolle. Die Tiere

3. Material und Methoden

der Versuchsgruppe 2 wurden insgesamt 3x mit je 0,1 g CHLO_1/kg KGW Ratte als niedrigste Dosierung behandelt. Versuchsgruppe 3 erhielt als nächsthöhere Dosierung 0,4 g CHLO_1/kg KGW Ratte. Versuchsgruppe 4 wurde mit 0,6 g behandelt, Versuchsgruppe 5 erhielt die höchste Dosierung mit 0,8 g CHLO_1/kg KGW Ratte. An den Tagen 24, 26 und 28 p.i. wurde der Kot der Ratten auf Eier hin untersucht. Die Sektion der Versuchstiere wurde 10 Tage nach der 1. Behandlung am Tag 33 p.i. durchgeführt, um sicherzugehen, dass nicht etwa noch nach der Behandlung vorhandene Scolices wieder eine Strobila produziert haben.

Tab. 3.20.: Behandlungsschema zur Überprüfung einer Aktivität des Extrakts CHLO_1 auf *H. diminuta*

Ratte Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW Ratte]	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW Ratte]
1 2	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
3 4	0,1	16
5 6	0,4	64
7 8	0,6	94

3.3.3. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *Fasciola hepatica* infizierten Wistar-Ratten

Drei Wistar-Ratten mit einem Anfangsgewicht von etwa 150 g wurden mit 12 Metacercarien pro Ratte oral infiziert. Beginnend mit Tag 70 p.i. wurde der Kot jeder Ratte auf Eier hin untersucht. Bei allen Versuchstieren konnten ab Tag 85 p.i. derartige Eier im Kot beobachtet werden. Ratte Nr. 1 diente als Infektionskontrolle und blieb unbehandelt. Die beiden anderen Versuchstiere (Nr. 2 und 3) wurden insgesamt 5mal an den Tagen 86-90 p.i. mit je 3,8 g CHLO_1/kg KGW Ratte behandelt. Kotproben zur Überprüfung des Infektionsgrads wurden an den Tagen 85, 87, 89, 91, 93 p.i. genommen.

3. Material und Methoden

Tab. 3.21.: 5malige Behandlung an den Tagen 86-90 p.i. mit Extrakt CHLO_1

Ratte Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW] pro Tag	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	3,8	600
3	3,8	600

3.3.4. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *Angiostrongylus cantonensis* infizierten Wistar-Ratten

Zur Überprüfung einer Wirksamkeit auf eine Nematodenart, die in den Pulmonalarterien parasitiert, wurde *A. cantonensis* als Parasitenmodell gewählt. Dazu wurden zwei infizierte Versuchsratten mit je einer Dosis von 3,8 g CHLO_1/ kg KGW Ratte an den Tagen 52, 53 und 54 p.i. oral per Zungensonde behandelt. Ratte Nr. 1 diente als Infektionskontrolle und blieb unbehandelt. Der Kot aller Versuchstiere wurde an den Tagen 52, 53, 54 und 56 p.i. auf L1-Larven hin untersucht.

Tab. 3.22.: 3malige Behandlung an den Tagen 52-54 p.i. mit Extrakt CHLO_1

Ratte Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW] pro Tag	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	3,8	600
3	3,8	600

3.3.5. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *Echinostoma caproni* infizierten Balb C-Mäusen

Zur Überprüfung einer Wirksamkeit auf eine darmständige Trematodenart wurde *E. caproni* in Mäusen als Parasitenmodell gewählt. Dabei diente Maus Nr. 1 als Infektionskontrolle und blieb unbehandelt. Versuchstier Nr. 2 wurde insgesamt 5x mit einer Dosis von 0,4 g CHLO_1/kg KGW Maus an den Tagen 39, 40, 42, 46 und 47 p.i. behandelt. Die

3. Material und Methoden

Eiausscheidungsrate wurde bei beiden Tieren ab Tag 35 bis Tag 49 p.i. beobachtet. Am Tag 50 p.i. wurden die Versuchstiere getötet und auf Trematoden hin untersucht.

Tab. 3.23.: 5malige Behandlung mit Extrakt CHLO_1 an den Tagen 39, 40, 42, 46 und 47 p.i.

Maus Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW Maus] pro Tag	Entsprechendes Trockengewicht [g/kg KGW Maus] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	0,4	64

3.3.6. Aktivitätsüberprüfung des Extraktes CHLO_1 bei einer mit *Toxocara cati* infizierten Hauskatze

Ein weiteres Nematodenmodell stellt *T. cati* dar. Eine natürlich mit diesem Parasiten infizierte Katze wurde insgesamt 5mal mit jeweils 6 ml reinem Kokoswasser am 25.-29.11.03 behandelt. Zur leichteren Applikation wurde das flüssige Endosperm mit handelsüblicher Katzenmilch verdünnt. Der Kot des Versuchstieres wurde vor und während der Versuchsdauer bis zum 02.12.03 auf Eier hin kontrolliert.

3.3.7. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *Taenia taeniaeformis* infizierten Hauskatzen

Zwei natürlich mit *Taenia taeniaeformis* infizierte Hauskatzen wurden insgesamt 5mal mit jeweils 6 ml reinem Kokoswasser am 23.-27.04.04 behandelt. Hier wurde (wie bereits beim Versuch Kap. 3.3.6.) das Endosperm mit Katzenmilch verdünnt. Die Analregion der beiden Tiere wurde zu Versuchsbeginn und danach mehrere Wochen lang auf das Austreten von Proglottiden hin kontrolliert.

3.3.8. Aktivitätsüberprüfung des Extrakts CHLO_1 bei mit *Eimeria papillata* infizierten Balb/C-Mäusen

Es wurden drei Balb/C Mäuse mit 40.000 *Eimeria papillata*-Oocysten oral per Zungensonde infiziert. Maus Nr. 1 diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Maus Nr. 2 und 3 wurde am Tag 2 p.i. und am Tag 3 p.i. mit jeweils 0,8 g CHLO_1 behandelt. Anschließend wurde ab dem Tag 5 der Kot aller Versuchstiere gesammelt und die Oocystenausscheidung beobachtet.

Tab. 3.24.: 2malige Behandlung *Eimeria papillata* infizierter Balb/C-Mäuse mit Extrakt CHLO_1

Maus Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW Maus] pro Tag	Entsprechende Menge Trockengewicht [g/kg KGW Maus] pro Tag
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle
2	0,8	128
3	0,8	128

3.3.9. Aktivitätsüberprüfung des Extraktes CHLO_1 bei mit *Trichomonas muris* infizierten Gerbils

Für diesen Behandlungsversuch wurden die selben Versuchstiere verwendet, die auch bei der Versuchsanordnung zur Überprüfung der Dosis-Wirkungsbeziehung des Chloroformextraktes CHLO_1 dienten (Kap. 3.2.5.5.). Dabei wurden die Tiere mit 5 unterschiedlich hohen Dosen des Extrakts behandelt (Tab. 3.13.). Gruppe 1 diente als Infektionskontrolle und erhielt keinerlei Behandlung. Bei der Sektion am Tag 54 p.i. wurde das Caecum aller Tiere vorsichtig eröffnet, eine kleine Menge des Inhalts auf einen Objektträger übertragen und unter dem Lichtmikroskop auf Trichomonaden hin untersucht.

3.4. In-vitro-Tests mit verschiedenen Wurmsspezies

Die im Kapitel 4.6.1. durchgeführten in-vivo-Behandlungsversuche zeigten keine Aktivität auf die Parasiten *Hymenolepis microstoma*, *Fasciola hepatica* und *Echinostoma caproni*. In in-vitro-Experimenten sollte nun überprüft werden, ob *Cocos nucifera* generell keine Wirkung auf die oben genannten Parasiten hat oder ob sich die Wirksamkeit nur auf Parasiten in bestimmten Organen des Wirtstierorganismus beschränkte.

3.4.1. *Hymenolepis microstoma*

Um die Aktivität des Kokosextrakts auf die Cestoden der Art *H. microstoma* zu testen, wurde 1 mg der zuvor als aktiv getesteten Fraktion 4 (Kap. 4.2.4.3.) gelöst in 1 ml Tyrode-Lösung in ein Well mit 5 Cestoden verbracht. Als Kontrollansatz diente 1 ml Tyrode-Lösung ohne Zusatz. Bei beiden Ansätzen wurde zu Beginn der pH-Wert kontrolliert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Mobilität der Bandwürmer beobachtet.

3.4.2. *Fasciola hepatica*

Auch bei diesem Parasiten sollte ein Effekt des Kokosextrakts in-vitro überprüft werden. Dazu wurde ebenfalls 1 mg der aktiven Fraktion 4 in ein Well mit 1 ml Tyrode-Lösung und 2 Trematoden verbracht. Als Kontrolle diente reine Tyrode-Lösung. Zu den Zeitpunkten T = 0 bis T = 6 Stunden wurde die Beweglichkeit der Würmer dokumentiert.

3.4.3. *Echinostoma caproni*

Es wurde 1 mg der aktiven Fraktion 4 in 1 ml Tyrode-Lösung gelöst und in ein Well mit 3-4 Trematoden verbracht. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Tyrode-Lösung ohne Zusatz. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Mobilität der Würmer beobachtet.

3.5. Morphologische Untersuchung zur Wirkweise der Extrakte aus *Cocos nucifera* beim Parasitenmodell *Trichuris muris*

Morphologische Untersuchungen von Nematodenquerschnitten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können die Schadefekte einer Substanz erkennen lassen. Die Behandlung der Nematoden mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen des vermeintlichen Wirkstoffs kann den Ablauf der Schädigung an den einzelnen Gewebetypen widerspiegeln. Es können jedoch keine Rückschlüsse über zellchemische Prozesse gezogen werden.

3.5.1. Fixierung

Die Nematoden und Cestoden aus den in-vitro-Versuchen (Kap. 3.4.1.) und aus dem in-vivo-Behandlungsversuch (Kap. 3.2.5.5.) wurden direkt in 3% Glutaraldehyd überführt und bei 4°C gelagert.

3.5.2. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die zuvor fixierten (behandelten und unbehandelten) Nematoden und Cestoden wie auch von *T. muris* befallenes Darmgewebe vom Gerbil wie folgt präpariert:

3. Material und Methoden

1. Waschen

3-5x je 5 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer

2. Entwässerung über eine aufsteigende Acetonreihe

15 min 20%

15 min 40%

15 min 60%

15 min 70%

15 min 80%

15 min 90%

15 min 96%

15 min 100% 2x

15 min 100% über Molekularsieb getrocknet

3. Critical-Point-Trocknung

6x mit Kohlendioxid spülen

bei 37°C und einem Druck von ca. 80bar 10 min trocknen

auf Rasterträger kleben

4. Besputtern mit Gold

Alle Proben werden in einem Gold-Sputtergerät 3x mit Argon gespült und anschließend mit Gold wie folgt besputtert:

Gewebestücke	5 min bei 25 mA
--------------	-----------------

Adultwürmer	3 min bei 25 mA
-------------	-----------------

3.5.3. Einbettung in EPON

Das gewonnene Versuchsmaterial aus den in-vitro- und in-vivo-Versuchen wurde in EPON nach folgender Methode eingebettet:

3. Material und Methoden

1. Waschen 2x 15 min in 0,1 M Cacodylatpuffer
2. Osmierung 2 h in 2% OsO ₄ in 0,1 M Cacodylatpuffer
3. Waschen 2x 15 min in 0,1 M Cacodylatpuffer, auf Eis
4. Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe, auf Eis 5 min 50% 15 min 70% 15 min 90% 15 min 96% 2x 30 min 100% über Molekularsieb getrocknet bei Raumtemperatur
5. Einbettung in EPON 30 min Propylenoxid 30 min 2 Vol Propylenoxid + 1 Vol EPON 1 h 1 Vol Propylenoxid + 1 Vol EPON ü. Nacht (1 h) 1 Vol Propylenoxid + 2 Vol EPON ü. Nacht EPON im Exsiccator Einbettung in Kapseln mit frischem EPON 24 h bei 40 °C im Ofen polymerisieren 24 h bei 60 °C im Ofen polymerisieren auskühlen lassen und aus den Kapseln nehmen

3.5.4. Lichtelektronenmikroskopie

3.5.4.1. Totalpräparate

Alle Würmer wurden direkt nach der Sektion der Versuchstiere unter einem Lichtmikroskop untersucht und alle Besonderheiten und Strukturveränderungen dokumentiert.

3.5.4.2. Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut OmU 3, Fa. Reichert) mit Hilfe von Glasmessern angefertigt. Zur Herstellung der Glasmesser wurde ein Messerbrechgerät (LKB 2178 Knifemaker II) verwendet. Die Schnittdicke der Semidünnschnitte betrug etwa 0,5 µm. Sie wurden von verschiedenen Körperabschnitten der behandelten und unbehandelten Würmer angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und dann bei ca. 60°C getrocknet. Für die Färbung wurde eine wässrige Methyleneblau-Lösung verwendet. Die Lösung wurde auf die getrockneten Semidünnschnitte aufgebracht und für 10 Sekunden einwirken gelassen. Dann wurde die Färbelösung mit Aqua bidest. vorsichtig abgespült und die Schnitte erneut getrocknet. Mit einem Harz wurden die Schnitte anschließend eingedeckelt und mit Hilfe einer Olympus-Kamera fotografiert.

3.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie

3.5.5.1. Ultradünnschnitte

Für die Ultradünnschnitte wurde das in EPON eingebettete Material ebenfalls an einem Ultramikrotom (Ultracut OmU 3, Fa. Reichert) mit Hilfe eines Diamantmessers geschnitten. Eine Schnittdicke von 50 – 70 nm wurde mittels des Temperaturvorschubs erreicht. Anschließend wurden die Schnitte vorsichtig auf kleine, kreisförmige, mit Formvar beschichtete Kupfernetze (mesh 75) überführt. Die so beladenen Kupfernetze wurden mit Hilfe einer Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die kontrastierten Schnitte wurden anschließend an einem TEM-Mikroskop fotografiert.

4. Ergebnisse

4.1. Aktivitätsüberprüfung verschiedener Gewebe von *Cocos nucifera*

Um eine biologische Aktivität einzelner Pflanzenteile der Kokospalme auf *Trichuris muris* zu überprüfen, wurden diese in einem Bioassay-System getestet. Wie bereits in der Literatur (Nadkarni 1976, Martinez 1999) postuliert, zeigte nur das feste und flüssige Endosperm der Kokosnuss eine anthelminthische Aktivität. Dabei wurde festgestellt, dass das Kokoswasser junger Nüsse (Tab. 4.1.) einen stärkeren Effekt auf die Würmer hatte als das Wasser reifer Nüsse. Während eine abtötende Wirkung im Ansatz mit 200 µl reifem Kokoswasser erst nach 24 Stunden auftrat, starben die Würmer in den Ansätzen mit dem Kokoswasser einer Trinknuss sowie einer sehr jungen Nuss (ca. 4 Monate) bereits nach 8 Stunden. Der stärkste anthelminthische Effekt wurde bei der Verwendung des festen, reifen Endosperms beobachtet. Bereits nach 3 Stunden traten erste Bewegungsstörungen bei den Würmern auf, nach 6 Stunden waren alle Nematoden in diesem Ansatz tot. Weder die Extrakte von Rinde, Blättern, Wurzel oder Schale zeigten eine anthelminthische Wirkung auf die Nematoden.

4. Ergebnisse

Tab. 4.1.: Überprüfung einer Aktivität verschiedener Gewebe von *Cocos nucifera* in einem in-vitro-Assay

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8	T = 24
Kontrolle	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Rinde	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Wurzel	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Blätter	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Endosperm	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-	-
Schale:								
Exokarp	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Mesokarp	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Endokarp	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	tot
Kokoswasser:								
Reife Nuss[> 12 M] 10 µl	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	tot
200 µl	NB	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot
500 µl	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-
Trinknuss [~11 M] 10 µl	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	tot
200 µl	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-
500 µl	NB	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-
Unreife Nuss [4 M] 10 µl	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	tot
200 µl	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-
500 µl	NB	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-

4.2. Entwicklung eines Extraktionsverfahrens

4.2.1. Lösungsmittel

Für die Extraktion des Kokosmaterials wurden Lösungsmittel unterschiedlicher Polaritäten verwendet. Bei stets gleich eingesetzter Substanzmenge von 1 g getrockneter Kokosflocken in 10 ml Lösungsmittel erwies sich die Extraktion mit Ethanol als Lösungsmittel am geeignetsten. Hier konnte eine wurmabtötende Wirkung bereits 4 h nach Inkubation beobachtet werden, wohingegen ein Effekt beim Reeluat des Methanol-Extrakts erst eine

halbe Stunde später eintrat. Bei den beiden polaren Extrakttypen Wasser und Acetonitril wurde eine abtötende Wirkung erst nach jeweils 5 h erreicht. Keine biologische Wirkung auf Nematoden hatte das Reeluat des Hexan-Extrakts. Auch die Zugabe des Lösungsvermittlers PEG hatte keinen Einfluss auf die Adultwürmer. In beiden Ansätzen sowie im Kontrollansatz mit reiner Tyrode-Lösung blieben die Nematoden über die gesamte Versuchszeit von 24 h voll bewegungsfähig. Aufgrund der bei den Vorversuchen gewonnenen Ergebnisse wurde für die folgenden Extraktionsversuche das Kokosmaterial mit Ethanol extrahiert.

Tab. 4.2.: In-vitro-Assay mit Lösungsmittelextrakten unterschiedlicher Polaritäten

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 3,5	T = 4	T = 4,5	T = 5	T = 24
Kontrolle	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Kontrolle + PEG	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Hexan + PEG	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Ethanol	NB	NB	NB	Langsam	M	tot	-	-	-
Methanol	NB	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-	-
Acetonitril	NB	NB	NB	NB	NB	M	M	tot	-
Wasser	NB	NB	NB	NB	NB	M	M	tot	-

4.2.2. Überprüfung der Thermostabilität

Um Hinweise auf die Hitzestabilität des gesuchten Wirkstoffes zu erhalten, wurden 5 gleiche Kokosextrakte hergestellt. Diese wurden jeweils 10 min bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und anschließend in Bezug auf ihre biologische Aktivität auf *T. muris* in einem in-vitro-Assay getestet. Dabei wurde eindeutig festgestellt, dass die Temperatur einen wichtigen Einfluss auf die Löslichkeit der Substanz hat. So zeigte sich bei niedrigen Temperaturen von 20°C und 30°C eine deutlich verzögerte Wirkung im Vergleich zur Extraktion bei Temperaturen von 40°C bis 96°C (Tab. 4.3.).

Tab. 4.3.: In-vitro-Assay zur Überprüfung der Hitzestabilität des Wirkstoffs bis 96°C

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = motil, Reaktion auf Berührungszreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 3,5	T = 4	T = 4,5	T = 6	T = 24
20°C	NB	NB	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-
30°C	NB	NB	NB	NB	langsam	M	M	tot	-
40°C	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-	-	-
60°C	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-	-	-
96°C	NB	NB	NB	langsam	M	tot	-	-	-

4.2.3. Aktivitätsüberprüfung von Proteinen und Peptiden der Kokosnuss

Um zu überprüfen, ob bei der Hitzebehandlung nicht denaturierte Proteine oder Peptide der Auslöser für den anthelminthischen Effekt sind, wurde ein Extrakt hergestellt, dem Proteinase K zugefügt wurde. Die Ergebnisse des Bioassays zeigten deutlich, dass trotz der Zugabe von Proteinase K, die ja Proteine unspezifisch denaturiert, der Extrakt noch eine Wirkung auf die Nematoden hatte. Die Wirkung trat zudem - verglichen mit dem Ethanol-Extrakt (Kap. 4.2.1.) - ebenfalls nach 4 Stunden Inkubationszeit ein (Tab. 4.4.).

Tab. 4.4.: In-vitro-Assay zur Aktivitätsüberprüfung von Proteinen und Peptiden

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8
Kontrolle	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Proteinase K -Extrakt	NB	NB	NB	langsam	tot	-	-

4.2.4. Isolierung und Reinigung

4.2.4.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Aufgrund der zuvor bei der Entwicklung eines Extraktionsverfahrens gewonnenen Erkenntnisse erschien es sinnvoll, das Probenmaterial mit Ethanol zu extrahieren und anschließend mit Hexan auszuschütteln, um alle störenden lipophilen Substanzen, wie z.B. Fette, zu entfernen. Da Polyphenole ebenfalls eine große Substanzgruppe darstellen und (wie bereits in Kap. 3.1.3.1. beschrieben) für die weitere Trennung erhebliche Nachteile bieten können, war es wichtig, diese aus dem Extrakt heraus zu isolieren und auf ihre

biologische Aktivität hin zu testen. Bei der Überprüfung der nach der Polyphenolextraktionsmethode von Wall et al. (1996) gewonnenen Chloroform- und Wasserphase in einem in-vitro-Assay, zeigte nur die Chloroformphase eine wurmabtötende Wirkung auf die *T.muris*-Nematoden. Kein Effekt konnte bei der Verwendung der wässrigen Phase festgestellt werden. Hier blieben die Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer von 24 h voll bewegungsfähig (Tab. 4.5.).

Tab. 4.5.: In-vitro-Assay zur Überprüfung der bei der Polyphenolextraktion angefallenen Chloroform- und Wasserphase

NB = normale Beweglichkeit, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8	T = 24
Kontrolle	NB							
Kontrolle + PEG	NB							
Chloroformphase	NB	NB	NB	M	tot	-	-	-
Wasserphase	NB							

4.2.4.2. Entwicklung und Optimierung eines Fließmittels mit Hilfe der DC

Die Suche nach einem geeigneten Fließmittelsystem zur Trennung bzw. Reinigung der einzelnen Substanzen mit Hilfe der DC wurde nach dem Optimierungsprinzip von CAMAG (Reich und George 1997) durchgeführt. Zunächst wurden stets die reinen Lösungsmittel verwendet. Dabei wurde mit Ethanol als Fließmittel eine Auftrennung der Substanzen in einen oberen Bereich, d.h. mit Rf-Werten nahe 1 und einen unteren Bereich mit Rf-Werten unter 0,3 erreicht (Abb. 4.1.). Um eine noch bessere Trennung zu erzielen, wurde das reine Lösungsmittel Ethanol mit unterschiedlichen Volumina Wasser kombiniert. Eine zufriedenstellende Trennung, bei der sich die meisten Substanzen in einen oberen, mittleren und unteren Bandenbereich ansammelten, konnte bei einem Fließmittelgemisch von 4 : 1 Ethanol/Wasser erreicht werden (Abb. 4.1). Mit diesem Elutionsgemisch wurde die unter Kap. 3.1.3.3. beschriebene Säulenchromatographie zur Elution des Extrakts CHLO_1 durchgeführt. Mit Chloroform kam es ebenfalls zu einer guten Trennung. Laut Literatur (Schwedt 1994) werden für die RP-Chromatographie meist jedoch polare Lösungsmittel, wie z.B. Methanol, Acetonitril oder Wasser, verwendet. Daher wurde auf das polare Elutionsgemisch Ethanol/Wasser zurückgegriffen.

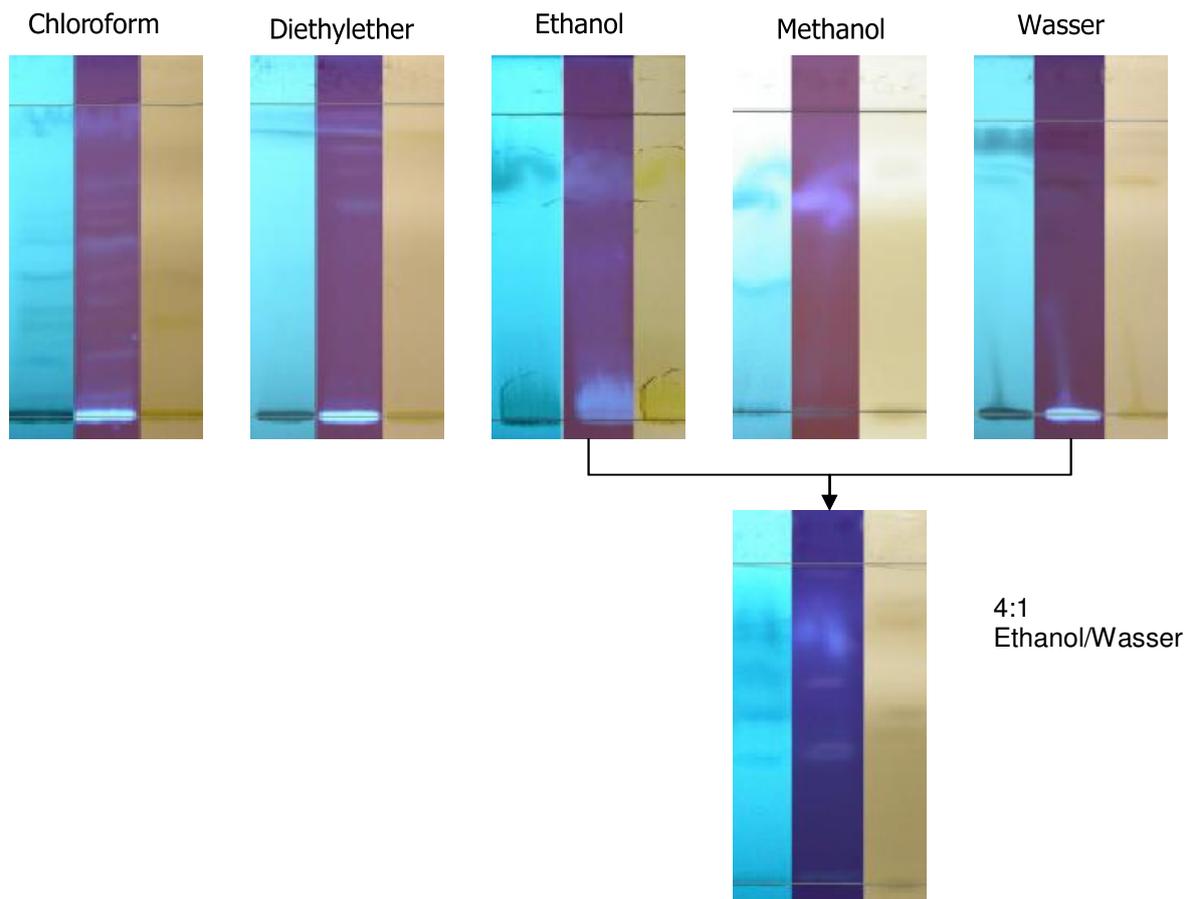


Abb. 4.1.: Fließmitteloptimierung nach CAMAG; Trennung des Extrakts CHLO_1 mit verschiedenen Lösungsmitteln.

4.2.4.3. Mitteldruck-Säulenchromatographie

Bei der Betrachtung der bei der Säulenchromatographie aufgefangenen Fraktionen 1-9, zeigten die Fraktionen 4-9 eine starke Gelbfärbung. Die restlichen Fraktionen 1-2 waren von weißer bis klarer Farbe, die Fraktionen 3 und 10-14 erschienen leicht gelb. Bei der Überprüfung der biologischen Aktivität der einzelnen Fraktionen in den in-vitro-Versuchen, wiesen die Nematoden in den Ansätzen mit den Fraktionen 4,5 und 6 bereits nach 2 h erste Lähmungserscheinungen auf. Nach 4 h waren alle Würmer in diesen Fraktionen tot. In den Fraktionen 3 und 7 zeigten die Nematoden erst nach 4 h erste Bewegungseinschränkungen und waren nach weiteren 4 h tot. Bei den restlichen Fraktionen waren auch nach 24 h keine Veränderungen im Vergleich zum Kontrollansatz festzustellen. Auch im Lichtmikroskop zeigten diese Nematoden das gleiche morphologische Erscheinungsbild wie die Kontrollwürmer.

4. Ergebnisse

Tab. 4.6.: Überprüfung der biologischen Aktivität der bei der Säulenchromatographie gewonnenen Fraktionen auf *Trichuris muris*-Nematoden.

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	eingesetzte Substanzmenge [mg] (Trockengewicht [g/Well])	T = 0	T = 2	T = 3	T = 4	T = 8	T = 24
Kontrolle	-	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 1	0	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 2	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 3	0,5	NB	NB	NB	langsam	tot	-
Fraktion 4	0,5	NB	langsam	M	tot	-	-
Fraktion 5	0,5	NB	langsam	M	tot	-	-
Fraktion 6	0,5	NB	langsam	M	tot	-	-
Fraktion 7	0,5	NB	NB	NB	langsam	tot	-
Fraktion 8	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 9	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 10	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 11	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 12	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 13	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 14	0,5	NB	NB	NB	NB	NB	NB

Die im in-vitro-Versuch als aktiv getesteten Fraktionen 4 bis 6 (Tab. 4.6.) wurden für die anschließende präparative Dünnschichtchromatographie aufbewahrt.

4.2.4.4. Präparative Dünnschichtchromatographie

Zunächst wurde ein Fließmittelsystem entwickelt, in dem sich die Fraktionen 4-6 gut auftrennen ließen. Bei einem Fließmittelgemisch von 4:2 Chloroform/Ethanol wurde eine hinreichende Trennung der Fraktionen auf den NP-DC-Platten erreicht. Die optische Überprüfung der Platten unter UV-Licht der Wellenlängen 254 und 366 nm erbrachte eine Vielzahl an unterschiedlich fluoreszierenden Banden. Bei der Überprüfung der markierten oberen Banden B1 bis B7 in einem in-vitro-Assay konnte nur bei dem Reeluat der Bande B2, die eine blau-türkise Fluoreszenz bei 366 nm (Abb. 4.2.) aufwies, eine anthelminthische Wirkung auf die Nematoden festgestellt werden. Hier zeigten sich bei den inkubierten Würmern wie in den vorangegangenen Experimenten (Kap. 4.2.4.3.) bereits nach 2 h erste Lähmungserscheinungen, nach weiteren 2 h waren alle Tiere tot. Die übrigen Ansätze erbrachten auch nach 24 Stunden keinerlei Aktivität auf die Nematoden (Tab. 4.7.).

Tab. 4.7.: Überprüfung einer biologischen Aktivität der bei der DC detektierten Banden B1-B7 in einem in-vitro-Assay

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = motil, Reaktion auf Berührungssreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 8	T = 24
Bande B1	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande B2	NB	NB	langsam	M	tot	-	-
Bande B3	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande B4	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande B5	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande B6	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande B7	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

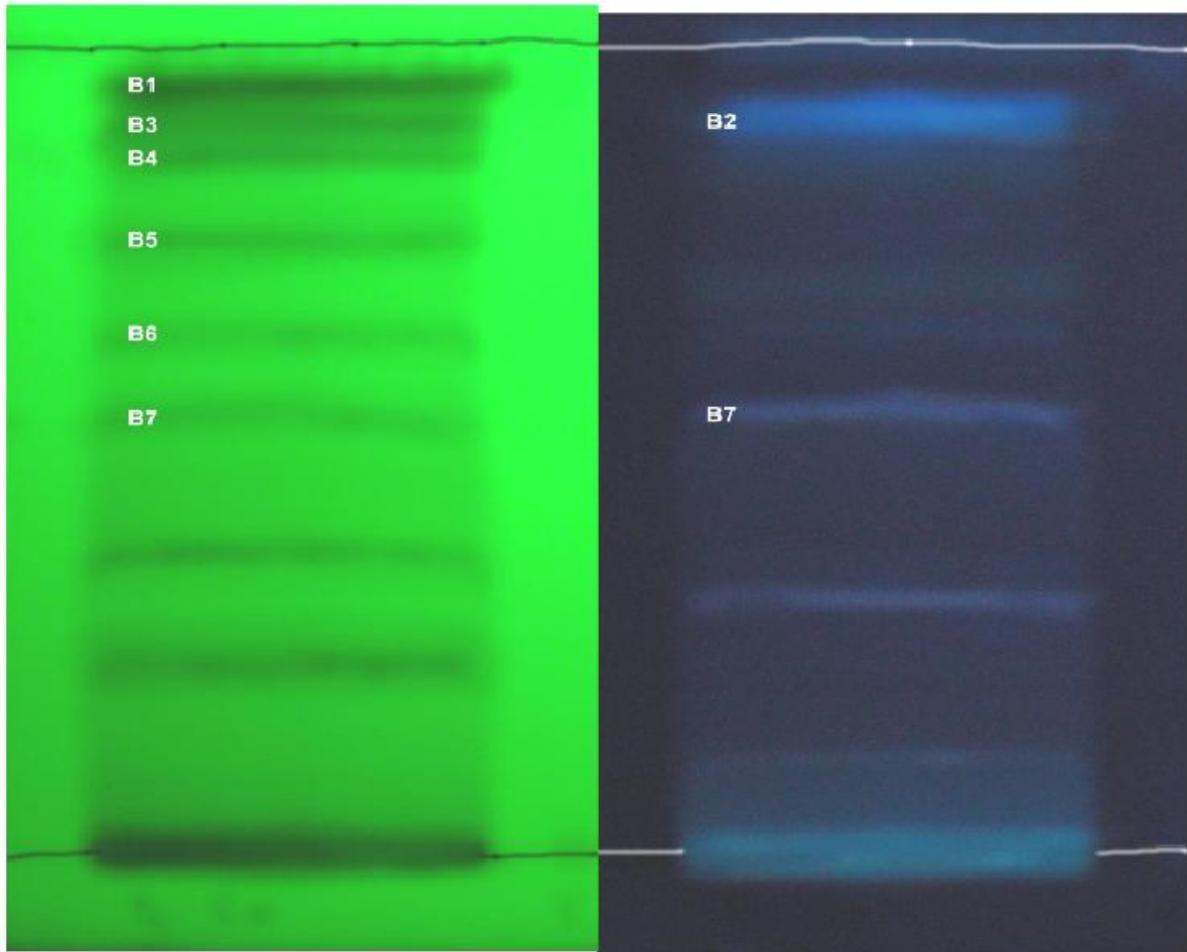


Abb. 4.2.: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Fraktionen 4-6 mit 4:2 Chloroform/Ethanol als Laufmittel. Detektion der Banden B1 bis B7 unter UV-Licht der Wellenlängen 254 nm (links) und 366 nm (rechts).

Zur weiteren Reinigung der Probe B2 wurde erneut ein Fließmittelsystem etabliert. Dazu wurde in Vorversuchen Toluol, Aceton und Essigsäureethylester als reine Lösungsmittel zur Elution verwendet. Dabei konnte die Probe B2 nur mit Aceton als Lösungsmittel in 5 deutlich detektierbare Banden X1 bis X5 getrennt werden (Abb. 4.4.). Die Banden X4 und X5 zeigten unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm eine türkisblaue bzw. eine leicht rötliche Fluoreszenz. Die restlichen Banden X1 bis X3 ließen sich mit Anisaldehyd-Schwefel-Reagenz lila anfärben. Die DC mit Toluol und Essigsäureethylester als Lösungsmittel trennte die Probe in 2 bzw. 3 Banden auf (Abb. 4.3.) und erwies sich daher als ungeeignet.

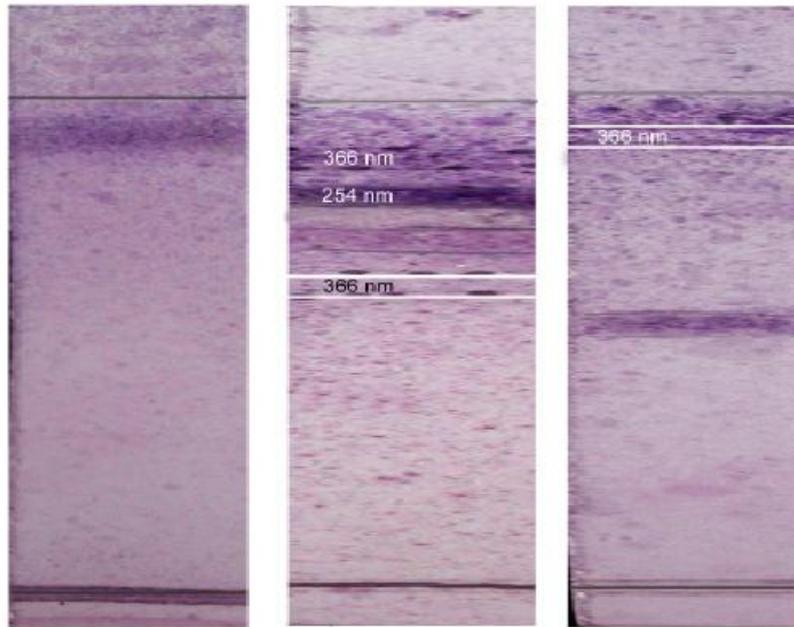


Abb. 4.3.: Fließmitteloptimierung zur Auftrennung der Probe B2. Detektion unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und 366 nm, Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefel-Reagenz. Lösungsmittel von links nach rechts: Toluol, Aceton, Essigsäureethylester.

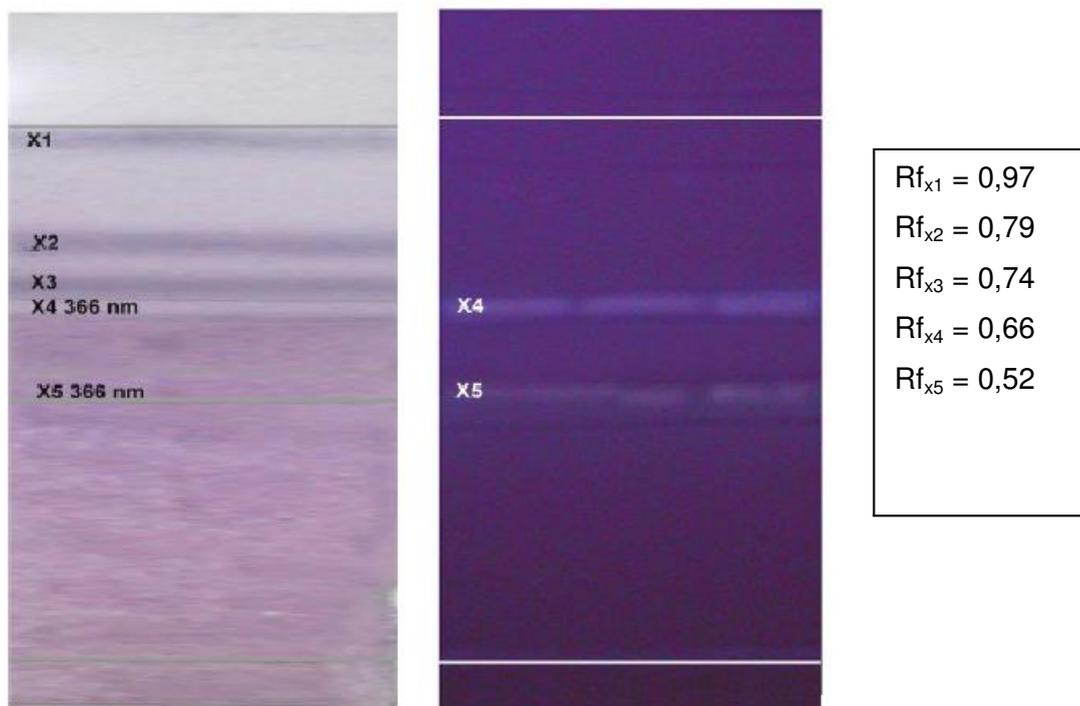


Abb. 4.4.: Trennung der Probe B2 mit 100% Aceton als Laufmittel. Detektion der Banden x1-x5 durch Anfärbung mit Anisaldehyd-Schwefel-Reagenz (links) und unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm (rechts) mit den dazugehörigen Retentionsfaktoren $R_{f_{x1}}$ bis $R_{f_{x5}}$.

Bei der Überprüfung der einzelnen Proben X1-X5 in in-vitro-Versuchen wurde bei Probe X4 eine biologische Aktivität beobachtet (Tab. 4.8.). Hier zeigten die adulten Nematoden bereits nach T = 3 Stunden erste Lähmungserscheinungen, nach 4 h Stunden waren alle Würmer in diesem Ansatz tot. In allen anderen Probenansätzen blieben die Nematoden 24 h lang voll bewegungsfähig und zeigten unter dem Lichtmikroskop das normale morphologische Erscheinungsbild.

Tab. 4.8.: Überprüfung der biologischen Aktivität der bei der präparativen DC gewonnen Proben X1-X5 auf *Trichuris muris*.

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = Motil, Reaktion auf Berührungszreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	eingesetzte Substanzmenge [mg] (Trockengewicht [g/Well])	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 8	T = 24
Kontrolle	-	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande X1	0,2	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande X2	0,19	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande X3	0,18	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Bande X4	0,2	NB	NB	langsam	M	tot	-	-
Bande X5	0,19	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

4.3. Strukturanalyse

4.3.1. GC-MS-Analyse

Der Durchlauf der Probe X4 in einem Gaschromatographen zeigte neben einigen Verunreinigungen 4 deutliche Peaks mit Retentionszeiten von $R_t = 4,58$ min; $7,07$ min; $7,99$ min; $9,10$ min und bei $R_t = 10,11$ min einen Hauptpeak (Abb. 4.5.). Bei der Datenbank-Recherche der dazugehörigen Massenspektren konnten den Peaks mit den Retentionszeiten $R_t = 10,11$ min; $R_t = 9,10$ min und $R_t = 7,07$ min die Substanzen α -Monolaurin, Decanoin (2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester) und o-Hydroxybiphenyl zugeordnet werden. Bei den beiden Substanzen α -Monolaurin (2,3-dihydroxypropyl ester) und Decanoin handelt es sich um Glyceride der gesättigten Fettsäuren, wobei vor allem α -Monolaurin, das Monoglycerin-

4. Ergebnisse

Derivat der Laurinsäure, in der pharmazeutischen Medizin bekannt ist für seine gute antimikrobiotische Wirkung (Oh und Marshall 1996). Desweiteren hat α -Monolaurin einen Effekt auf RNA und DNA-Viren (Clark und May, 2000), verschiedene gram-positive Bakterien (Peterson und Schlievert 2006) und einzelne pathogene Protozoen (Sun et al. 2003; Bergsson et al. 2002). Eine weitere Substanz, die sich mit Hilfe der Datenbankanalyse detektieren ließ, ist o-Hydroxybiphenyl (Abb. 4.7.). Dabei handelt es sich um einen Wirkstoff, der als Fungizid in der Wachsschicht von Zitrusfrüchten und als Bakterizid bzw. Desinfektionsmittel bei der Konservierung von Früchten eingesetzt wird (Merck Index).

Der Peak mit der Retentionszeit $R_t = 7,99$ min ließ sich nicht mit Hilfe der im Institut für Analytische Chemie zur Verfügung gestellten Datenbank analysieren.

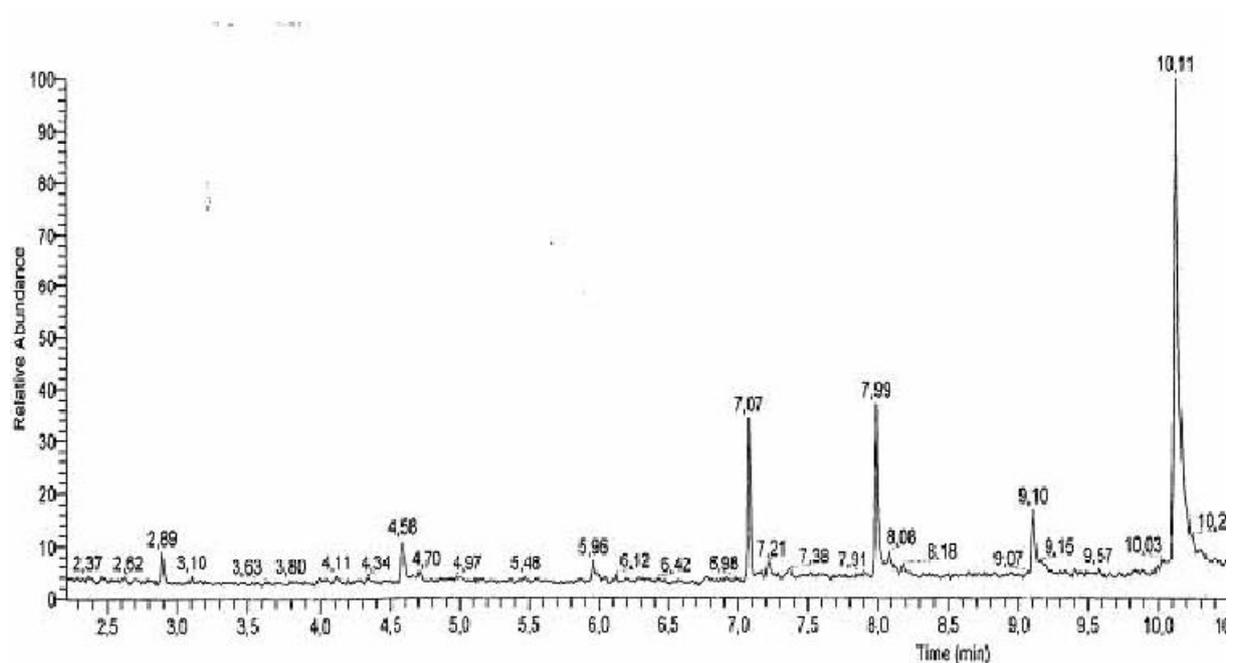


Abb. 4.5.: Gas-Chromatogramm der Probe X4

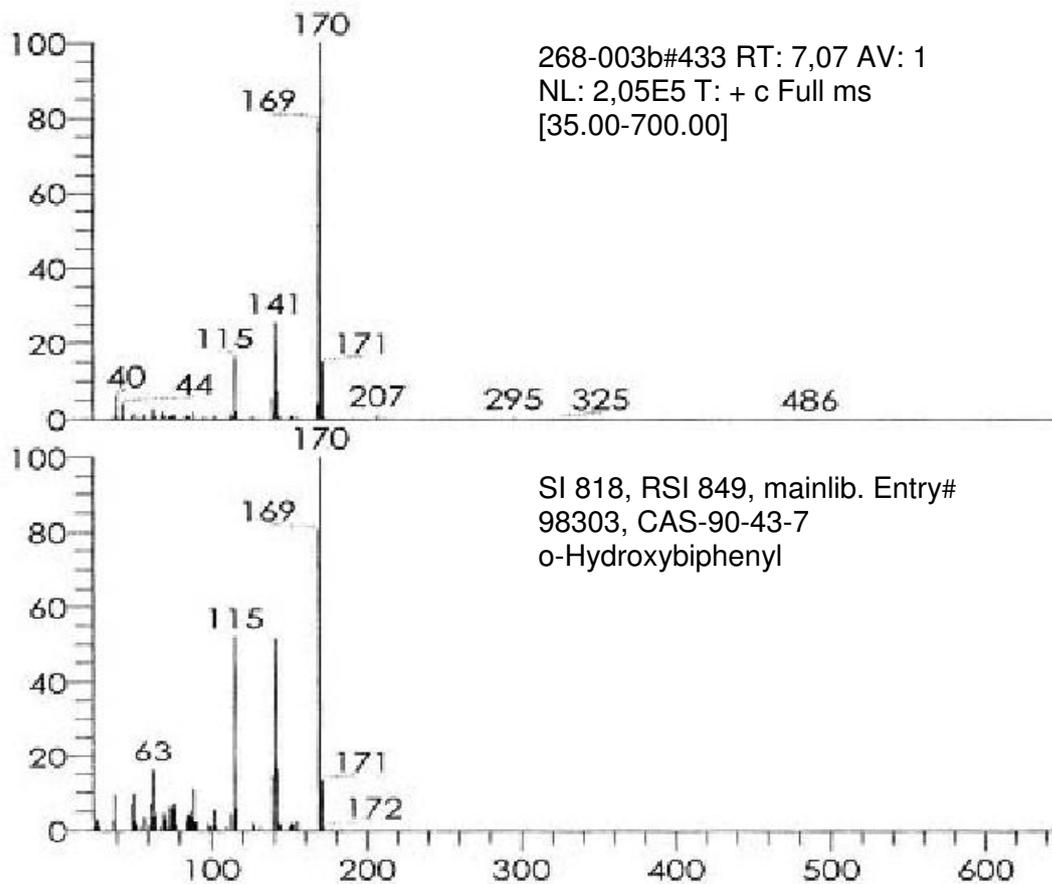


Abb. 4.6.: Massenspektrum von o-Hydroxybiphenyl (oben: Originaldaten; unten: Ergebnis nach Datenbankabgleich)

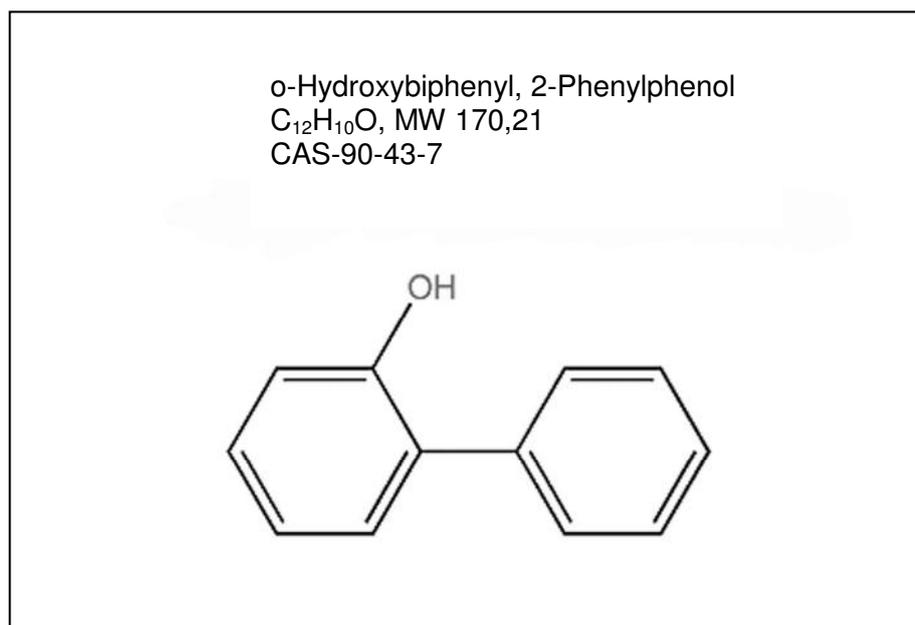


Abb. 4.7.: Strukturformel von o-Hydroxybiphenyl

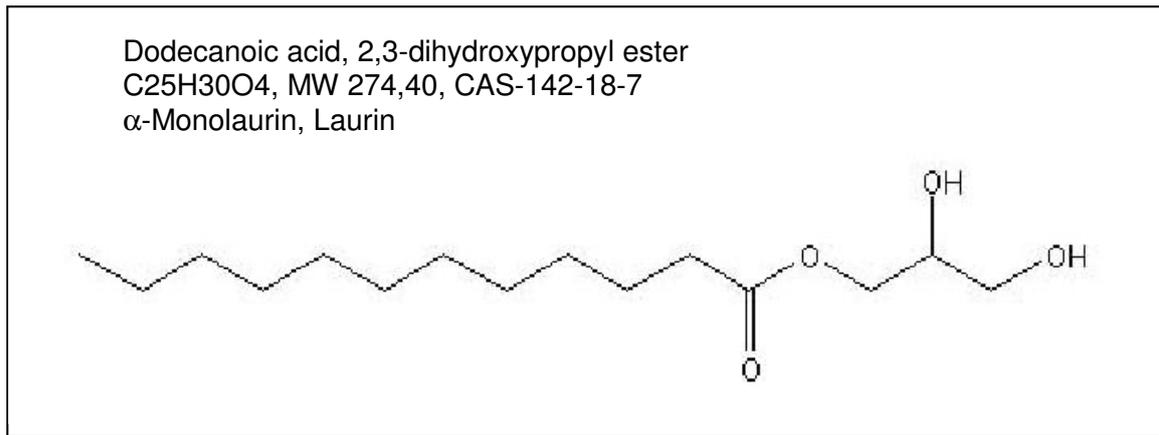


Abb. 4.8.: Substanzformel von α-Monolaurin

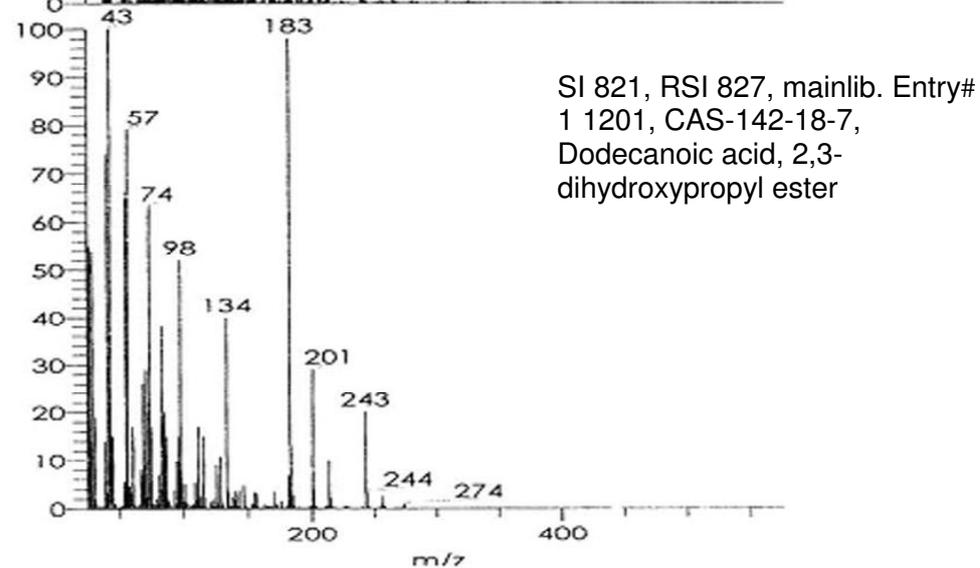
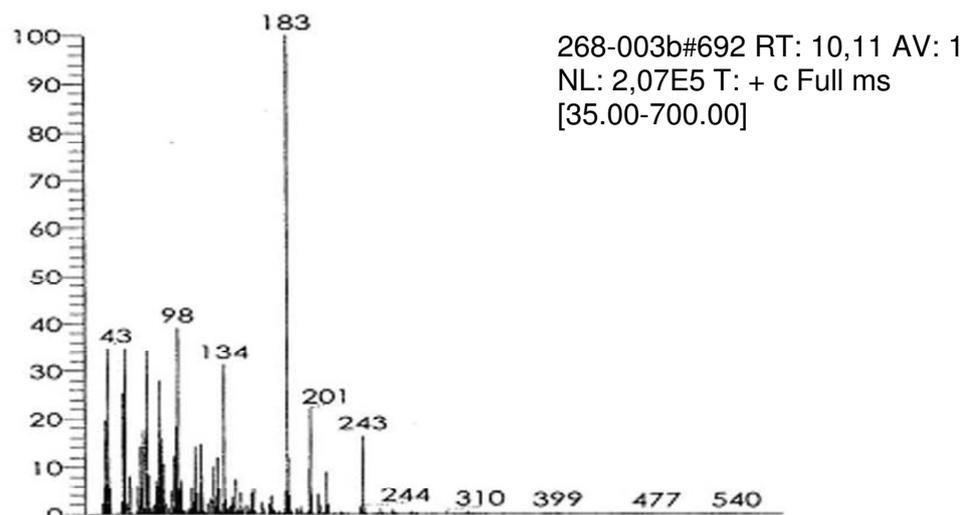


Abb. 4.9.: Massenspektrum von Substanz-Peak Nr. 1 mit Rt = 10,11 min (oben: Originaldaten; unten: Ergebnis nach Datenbankabgleich).

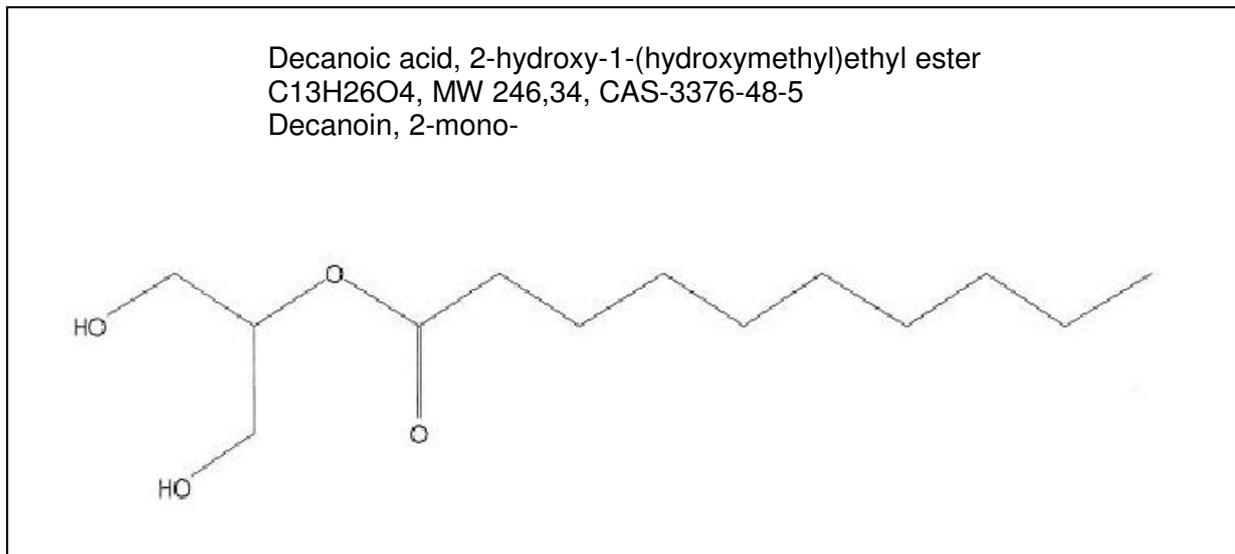


Abb. 4.10.: Substanzformel von Decanoïn

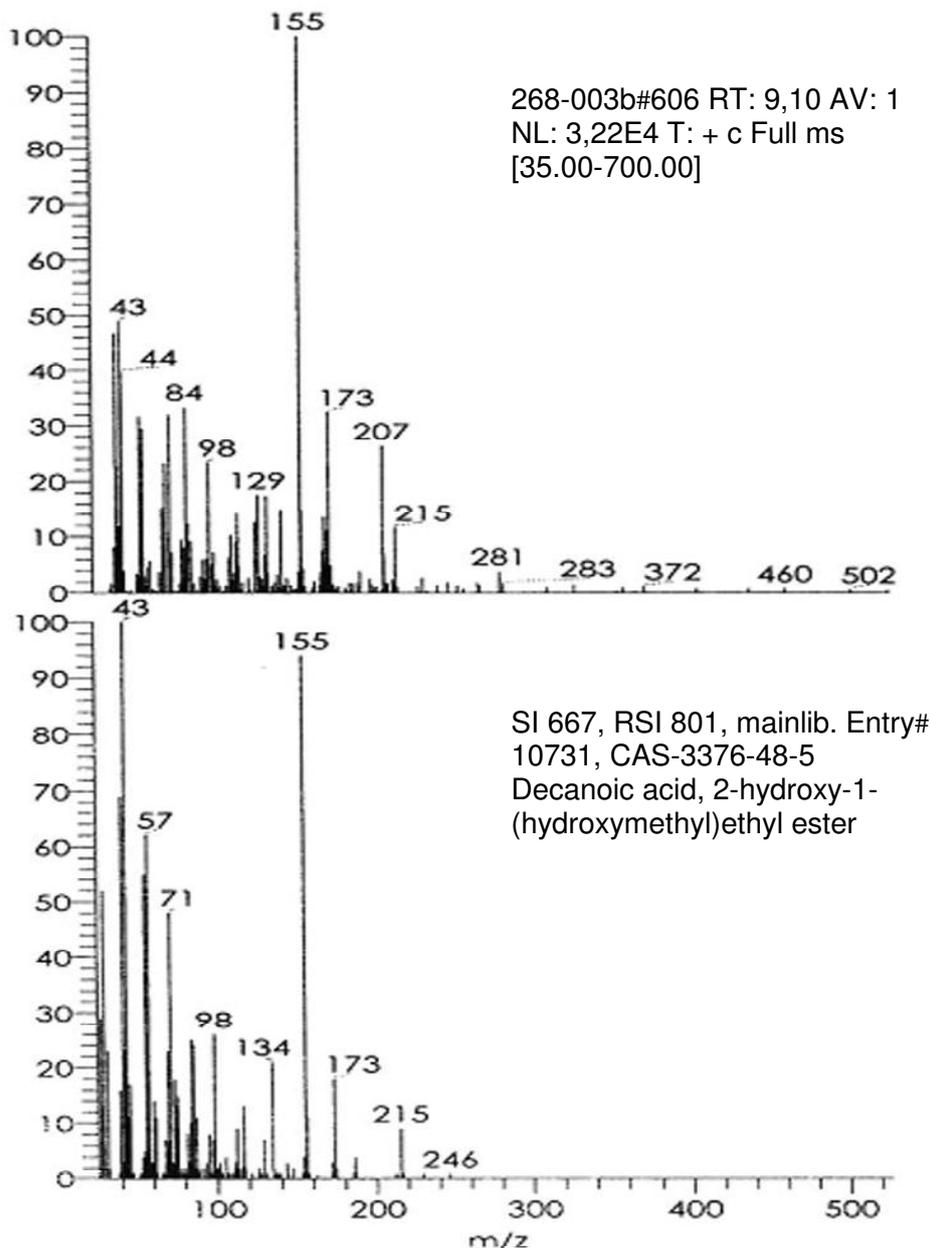


Abb. 4.11.: Massenspektrum von Substanz-Peak Nr. 2 mit Rt = 9,10 min (oben: Originaldaten; unten: Ergebnis nach Datenbankabgleich).

4.3.2. NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Untersuchung der Probe x4 wurde am Institut für Pharmazie in Groningen in Holland unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kayser durchgeführt. Das Ergebnis der spektroskopischen Untersuchung zeigte ein Hydroxybiphenyl, Das mit einer Glukose verknüpft ist (Abb. 4.12.) und als 4`hydroxy[1,1`-biphenyl]-4-yl (Datenbank: Skifinder) bezeichnet wird.

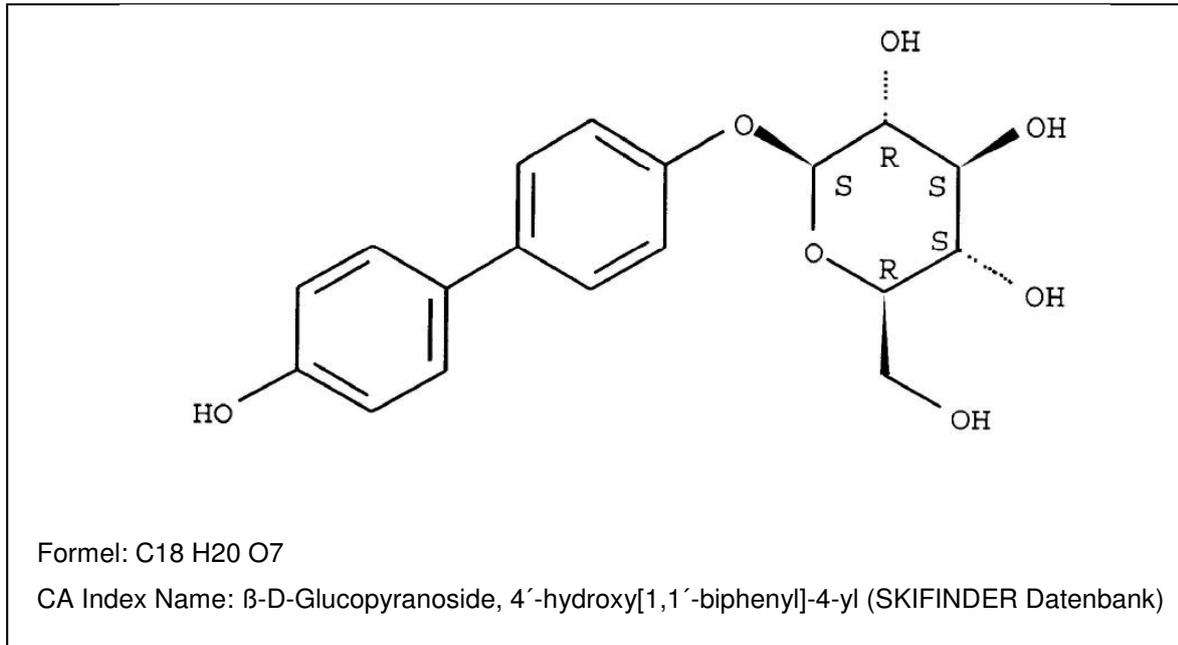


Abb. 4.12.: β-D-Glucopyranoside, 4'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl

4.4. Etablierung eines Bioassays

Die Tabelle (Tab. 4.9.) zeigt deutlich, dass die Redien von *E. caproni* schon nach kürzester Zeit Schaden nahmen, und dies auch schon bei sehr geringen Konzentrationen. Es konnte jedoch nicht unbedingt ein Rückschluss auf die Wirkstoffmenge, d.h. die Konzentrationsstärke gezogen werden. Ab einer Konzentration von 10 mg/ml waren alle Redien zum gleichen Zeitpunkt nach maximal ½ Stunde tot. Die Überlebensdauer der Redien im Kontrollansatz lag hingegen bei etwa 6 Stunden bis maximal 8 Stunden. Im Vergleich dazu zeigten die L1-Larven der Nematodenart *Angiostrongylus cantonensis* bei den unterschiedlichen Konzentrationen auch diesbezüglich eine veränderte Beweglichkeit. Bei einer Konzentration von 10 mg/ml starben die Larven nach etwa 6 Stunden, bei einer höheren Konzentration von 100 mg/ml schon nach 4 Stunden. Ein Nachteil bei diesem Bioassay-System lag darin, dass in den Kontrollansätzen (wie auch in allen anderen Konzentrationsstufen) einzelne Larven vorzeitig verendeten. Bei sehr kleinen Probenansätzen mit nur wenigen Larven als Testparameter könnte das Ergebnis verfälscht werden. Als sehr guter Testorganismus stellte sich *T. muris* laut der in-vitro-Ergebnisse (Tab. 4.9.) heraus. Hier wurden im Gegensatz zu allen anderen Testparametern deutlich erste Mobilitätsstörungen in Abhängigkeit von der Konzentration gezeigt.

Tab. 4.9.: Untersuchung verschiedener Konzentrationen des Kokos-Extrakts an drei Testorganismen in einem Bioassay

NB = normale Beweglichkeit, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = ½	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8	T = 24
Redien Kontrolle	NB								
Redien 0,005 g/ml	NB	NB	M	tot	-	-	-	-	-
Redien 0,01 g/ml	NB	tot	-	-	-	-	-	-	-
Redien 0,1 g/ml	NB	tot	-	-	-	-	-	-	-
A.c.-L1 Kontrolle	NB								
A.c.-L1 0,005 g/ml	NB	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-
A.c.-L1 0,01 g/ml	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-	-
A.c.-L1 0,1 g/ml	NB	NB	NB	NB	M	tot	-	-	-
<i>T.m.</i> Kontrolle	NB								
<i>T.m.</i> 0,005 g/ml	NB	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-
<i>T.m.</i> 0,01 g/ml	NB	NB	NB	NB	NB	M	tot	-	-
<i>T.m.</i> 0,1 g/ml	NB	NB	NB	NB	M	tot	-	-	-

4.5. In-vivo-Behandlungsversuche

4.5.1. Überprüfung der Hitzestabilität

Bei der Überprüfung der Thermostabilität des gesuchten Wirkstoffes in einem in-vivo-Experiment zeigt die Graphik in Abb. 4.13. deutlich, dass auch hier wie im zuvor durchgeführten in-vitro-Test (Kap. 4.2.2.) eine Temperatureinwirkung von 96°C auf den Extrakt keinerlei Auswirkungen auf dessen biologische Aktivität gegen die *Trichuris muris* Nematoden hatte. Nach der zweiten Behandlung am Tag 50 p.i. mit einer Dosis von 32 g

4. Ergebnisse

Trockengewicht/kg KGW Gerbil wurde eine starke Reduktion der Eizahl/g Fäzes bei dem mit dem erhitzten Extrakt behandelten Tier Nr. 2 festgestellt. Bei der am Tag 54. p.i. durchgeführten Sektion der Versuchstiere zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der angetroffenen Würmer. So waren in der Infektionskontrolle 82 Nematoden aufzufinden, während im behandelten Gerbil Nr. 2 lediglich 24 Nematoden (Tab. 4.11.) angetroffen wurden. Dies entspricht einer Reduktion von etwa 70% - bezogen auf die Anzahl der im Kontrolltier Nr. 1 aufgefundenen Würmer.

Tab. 4.10.: Anzahl der Eier im Kot der Infektionskontrolle Nr. 1 und des an zwei aufeinander folgenden Tagen 49 und 50 p.i. mit 96°C erhitztem Kokosextrakt mit einer Dosis von 32 g Kokosfleisch/kg KGW Gerbil behandelten Tieres Nr. 2.

Tier Nr.	Tag p.i.							
	45	46	47	48	49	50	51	54
1	102344	101178	78987	130982	90875	115673	99556	100778
2	90687	111516	83133	98214	132568	27606	9792	8982

Tab. 4.11.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 54 p.i. gefundenen ♀ und ♂ Nematoden beim Kontrolltier Nr. 1 und dem mit 96°C erhitztem Kokosextrakt behandelten Tier Nr. 2.

Tier Nr.	Wurmzahl Tag 54 p.i.		
	♀	♂	gesamt
1	45	37	82
2	3	21	24

Reduktion der Anzahl der Würmer ca. 70 %

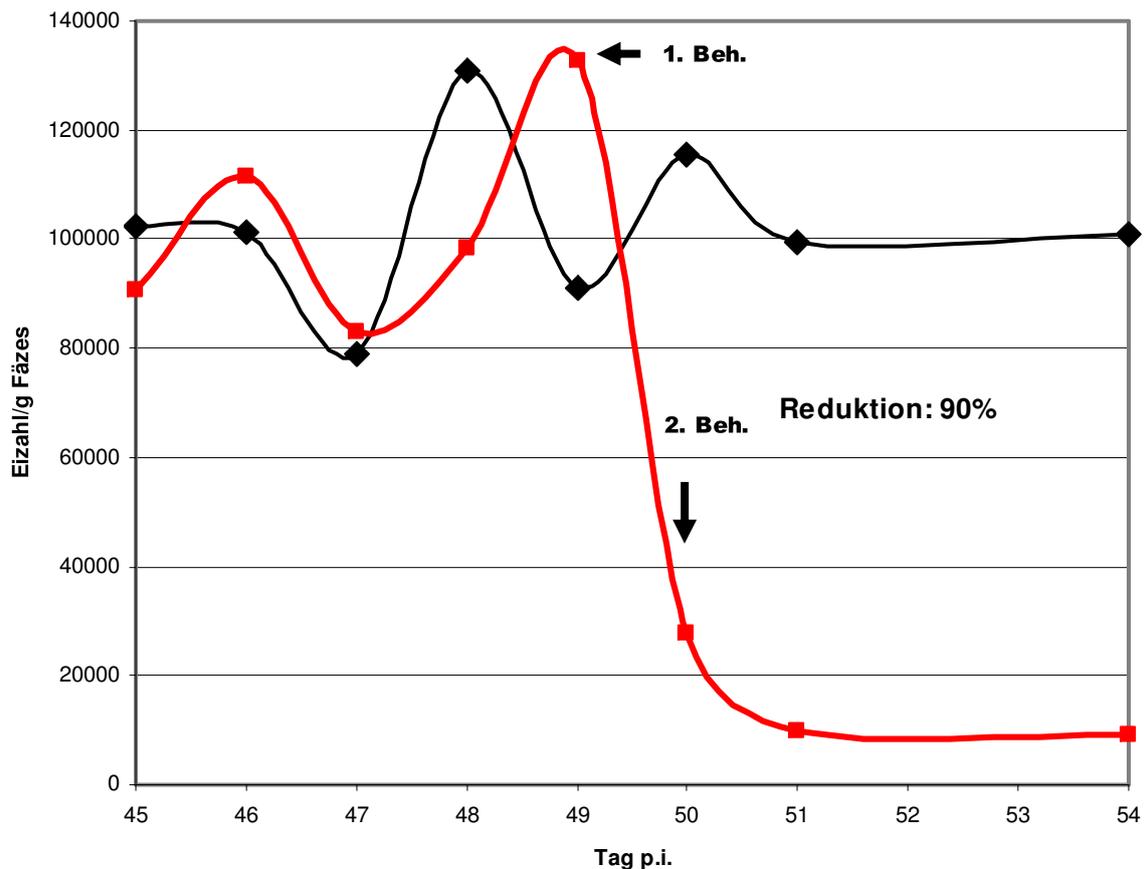


Abb. 4.13.: Eiausscheidung nach Behandlung mit 96°C erhitztem Kokos-Extrakt an zwei aufeinander folgenden Tagen (49, 50 p.i.) mit einer Dosis von 32 g Trockengewicht Kokosfleisch/kg KGW Gerbil (Tier Nr. 2, rote Linie). Tier Nr.1 diente als Kontrolle (schwarze Linie).

4.5.2. Aktivitätsüberprüfung der Hexan- und der Ethanol-Phase

Zur Bestätigung der in den in-vitro-Versuchen gewonnenen Ergebnisse wurde sowohl die Hexan-Phase als auch die Ethanol-Phase in einem in-vivo-Behandlungsversuch bei mit *Trichuris muris* infizierten Gerbils getestet. Die Graphik (Abb. 4.14.) zeigt zunächst eine leichte Abnahme der Eizahl beim mit der Hexan-Phase behandelten Tier Nr. 2 nach der 1. Behandlung am Tag 49 p.i. (mit 0,25 g Hexanphase/kg KGW). Das mit dem Ethanol-Extrakt behandelte Tier Nr. 3 zeigte hingegen einen leichten Anstieg in der Eiausscheidung. Nach der 2. Behandlung am Tag 50 p.i. ist die Zahl der ausgeschiedenen Eier bei Versuchstier Nr. 2 im Vergleich zum Wert nach der 1. Behandlung auf den Ursprungswert angestiegen. Beim Versuchstier Nr. 3 war hingegen eine deutliche Abnahme der Eizahl zu beobachten. Die Anzahl der mit den Fäzes ausgeschiedenen Eier des Kontrolltieres pendelte während der gesamten Versuchsdauer um einen Mittelwert von etwa 61 900 (Abb. 4.14.). Die bei Gerbil Nr. 3 beobachtete Reduktion der Eier konnte bei der am Tag 52 p.i. durchgeführten Sektion

4. Ergebnisse

der Versuchstiere bestätigt werden. Es waren noch 33 Nematoden im Caecum des Gerbils anzutreffen, wohingegen beim mit der Hexanphase behandelten Tier Nr. 2 119 und bei der Kontrolle Nr. 1 73 Nematoden aufgefunden wurden (Tab. 4.13.).

Tab. 4.12.: Anzahl der Eier im Kot der Infektionskontrolle Nr. 1 und der an den Tagen 49 und 50 p.i. mit 0,25 g Hexanphase/kg KGW Gerbil bzw. 0,15 g Ethanolphase/kg KGW Gerbil behandelten Tiere Nr. 2+3.

Tier Nr.	Tag p.i.						
	45	46	47	49	50	51	52
1	60 180	67 800	77 123	66 541	45 886	65 345	50 514
2	97 033	105 667	101 345	67 456	89 744	104 221	113 623
3	79 554	90 876	98 776	100 042	21 223	11 778	10 999

Tab. 4.13.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 52 p.i. gefundenen ♀ und ♂ Nematoden bei dem Kontrolltier Nr. 1 und den mit der Hexanphase bzw. der Ethanolphase behandelten Tiere Nr. 2 +3.

Tier Nr.	Wurmzahl Tag 52 p.i.		
	♀	♂	gesamt
1	39	34	73
2	66	53	119
3	12	21	33

Reduktion der Anzahl der Würmer ca. 68%

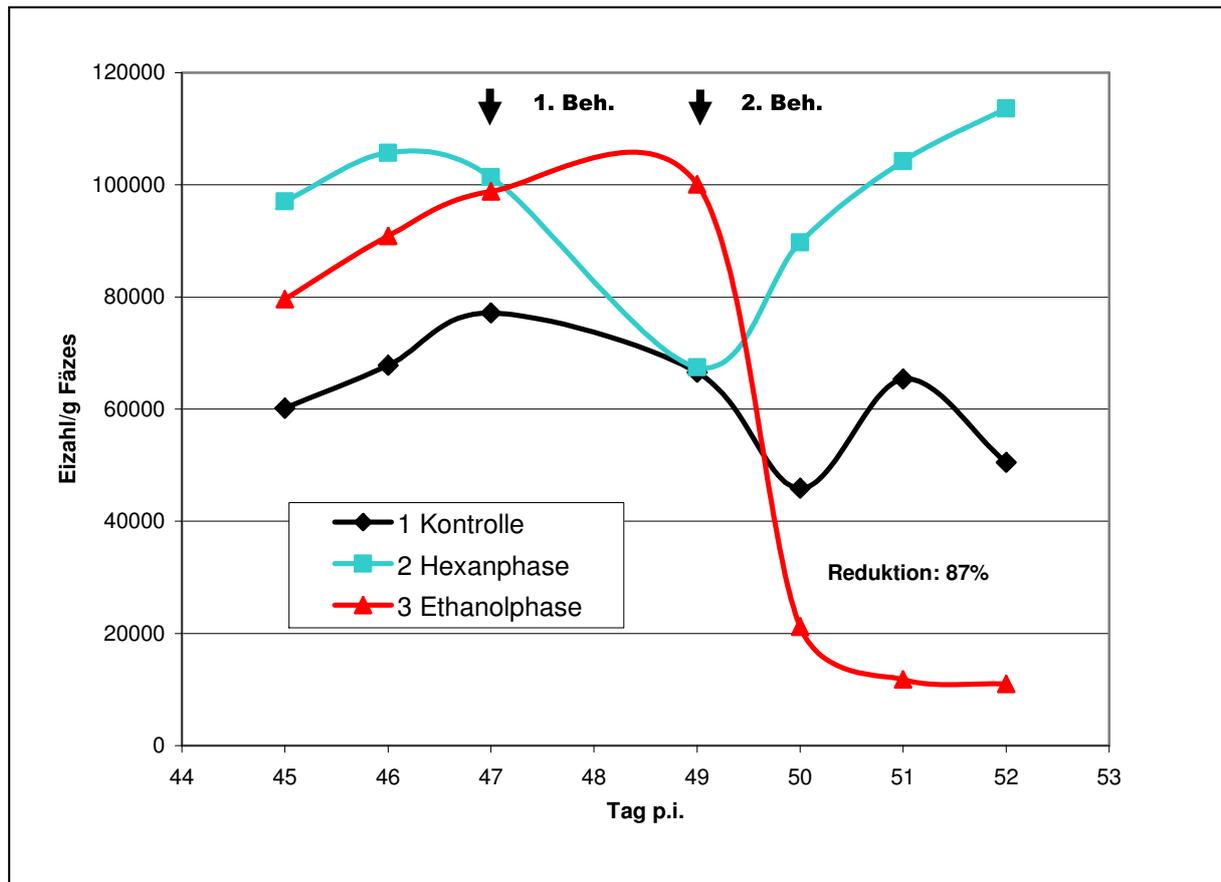


Abb. 4.14.: Eiausscheidung nach Behandlung mit 0,25 g Hexanphase und 0,15 g Ethanolphase /kg KGW Gerbil pro Tag der Tiere Nr. 2+3 an den Tagen 47 und 49 p.i. Gerbil Nr. 1 diente als Kontrolle.

4.5.3. Aktivitätsüberprüfung der Chloroform- und der Wasser-Phase

Die Graphik (Abb. 4.15.) bestätigt die im in-vitro-Experiment (Kap. 4.2.4.1.) gewonnenen Ergebnisse. Auch hier zeigte die Behandlung von Tier Nr. 3 mit 1,4 g Wasserphase/kg KGW Gerbil während der gesamten Versuchsdauer keine signifikante Reduktion in der Anzahl der ausgeschiedenen Eier (Tab. 4.14). Auch bei der Sektion des Tieres am Tag 53 p.i. konnte kein Unterschied in der Zahl der aufgefundenen Nematoden zum nichtbehandelten Kontrolltier festgestellt werden. Hingegen zeigte sich bei Gerbil Nr. 2 bereits nach der 1. Behandlung am Tag 48 p.i. mit einer Dosis von 1 g Chloroformphase/kg KGW eine starke Reduktion der Eizahl/g Fäzes. Bei der Sektion des Tieres waren lediglich 25 Nematoden im Caecum aufzufinden (Tab. 4.15.). Das unbehandelte Kontrolltier Nr. 1 und das mit der Wasserphase behandelte Versuchstier Nr. 3 wiesen mit 105 bzw. 112 etwa die gleiche Anzahl an Würmern auf.

4. Ergebnisse

Tab. 4.14.: Anzahl der im Fäzes gefundenen Eier nach einer Behandlung mit 1 g Chloroformphase/kg KGW Gerbil (Tier Nr. 2) bzw. 1,4 g Wasserphase/kg KGW Gerbil (Tier Nr. 3) an den Tagen 48 und 51 p.i.

Tier Nr.	Tag p.i.						
	45	46	47	48	51	52	53
1	77601	91134	105432	98987	117203	110991	98667
2	96889	113442	104456	88978	9123	9067	9004
3	132112	101536	99776	78554	112001	100333	99031

Tab. 4.15.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 53 p.i. gefundenen ♀ und ♂ Nematoden bei dem Kontrolltier Nr. 1, dem mit der Chloroformphase behandelten Tier Nr. 2 und dem mit der Wasserphase behandelten Tier Nr. 3.

Tier Nr.	Wurmzahl Tag 53 p.i.		
	♀	♂	gesamt
1	57	48	105
2	7	18	25
3	62	50	112

Reduktion der Anzahl der Würmer ca. 74%

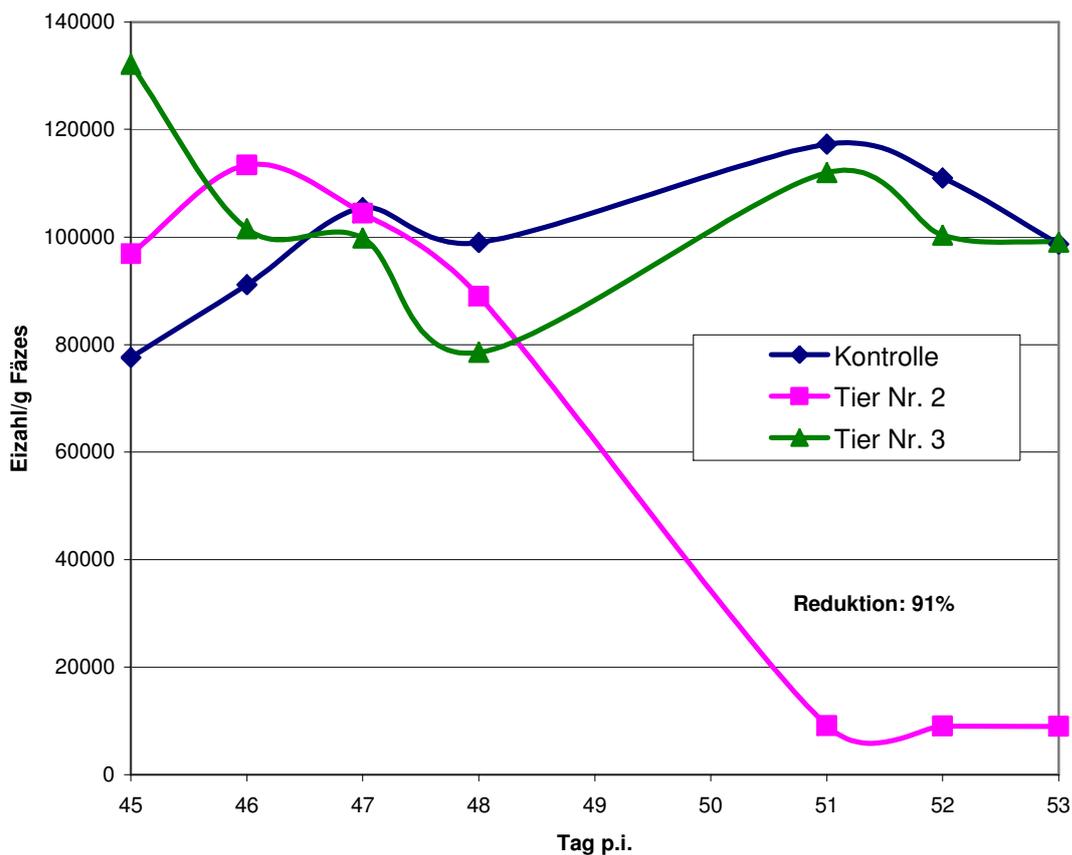


Abb. 4.15.: Eiausscheidung nach Behandlung mit beiden Phasen der Polyphenolextraktions-Methode an zwei aufeinander folgenden Tagen (48, 51 p.i.) mit einer Dosis von 1 g Chloroformphase/kg KGW Gerbil (Tier Nr. 2, rosa Linie) und 1,4 g Wasserphase/kg KGW Gerbil (Tier Nr. 3, grüne Linie). Tier Nr.1 diente als Kontrolle (blaue Linie).

4.5.4. Aktivitätsüberprüfung der Fraktionen 4-6 und der Fraktionen 8-14

Bei der 1maligen Behandlung mit 4 mg der in den in-vitro-Versuchen (Kap. 4.2.4.3.) als aktiv getesteten Fraktionen 4-6, konnte eine deutliche Reduktion der Eizahl am Tag 50 p.i. bei Versuchstier Nr. 2 festgestellt werden. Im Vergleich dazu zeigte sich bei dem mit den Fraktionen 8-14 behandelten Tier Nr. 3 keinerlei Abnahme der Eizahl nach der Applikation von 7 mg am Tag 48 p.i. (Tab. 4.16.) Bei der am Tag 50 p.i. durchgeführten Sektion beider Versuchstiere wurden bei dem mit den Fraktionen 4-6 behandelten Gerbil Nr. 2 erheblich weniger Nematoden im Caecum aufgefunden als bei dem mit den Fraktionen 8-14 behandelten Tier Nr. 3. Die Anzahl der hier angetroffenen Nematoden war vergleichbar mit der, der Infektionskontrolle Nr. 1 (Tab. 4.17).

Tab. 4.16.: Anzahl der bei der Kotuntersuchung aufgefundenen Eier nach einer Behandlung der Versuchstiere mit 4 mg der Fraktionen 4-6 (Tier Nr. 2) bzw. 7 mg der Fraktionen 8-14 (Tier Nr. 3) am Tag 48 p.i.

Gerbil Nr.	Tag p.i.			
	46	48	49	50
1	121212	65333	91489	101224
2	107052	104714	29712	30965
3	99962	119326	107316	99537

Tab. 4.17.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 50 p.i. aufgefundenen Nematoden bei den mit 4 mg der Fraktionen 4-6 (Tier Nr. 2) bzw. 7 mg der Fraktionen 8-14 (Tier Nr. 3) behandelten Versuchstiere.

Tier Nr.	Wurmzahl Tag 50 p.i.		
	♀	♂	gesamt
1	56	44	100
2	23	11	34
3	54	47	101

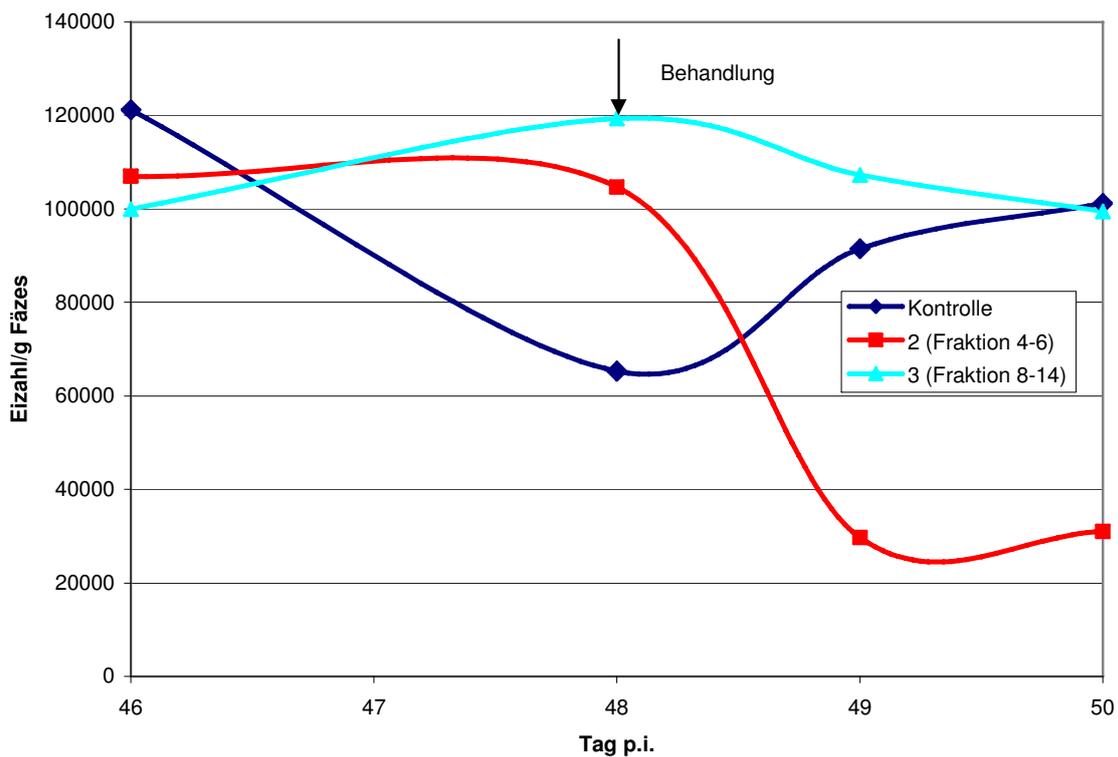


Abb. 4.16.: Eisausscheidung nach Behandlung zweier Versuchstiere mit den bei der Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen 4-6 (Tier Nr. 2, rote Linie) und den Fraktionen 8-14 (Tier Nr. 3, türkise Linie) am Tag 48 p.i.

4.5.5. Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden 5 Versuchsgruppen (Nr. 2-6) mit Konzentrationen des Extrakts CHLO_1 von 0,2 – 6 g/kg KGW Tier behandelt. Die Versuchsgruppe Nr. 1 diente als Infektionskontrolle. Die 1x Behandlung der infizierten Gerbils Nr. 26, 27, 28 (Versuchsgruppe 6) mit einer Dosis von 6 g CHLO_1 /kg KGW erzielte eine signifikante Reduktion der Wurmzahl von 98,9% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren Nr. 1-5 der Gruppe 1. Die noch vorhandenen Nematoden waren bewegungsunfähig und nur sehr lose im Epithel der Mukosa verankert. Es wurden bei den 3 Tieren der Versuchsgruppe 6 lediglich 1 bis maximal 2 männliche Exemplare von *T. muris*-Nematoden im Caecum aufgefunden (Tab. 4.18.). Bei der Versuchsgruppe 5 konnte bei der nächstniedrigeren Behandlungsstufe von 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil eine Reduktion der Wurmlast von etwa 91,5% beobachtet werden. Auch hier waren alle im Caecum vorhandenen Nematoden leicht aus der Mukosa zu entfernen und stark bewegungseingeschränkt. Nach der 1x Behandlung mit einer Dosis von 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil wurden bei der Gruppe 4 im Mittel noch 17,3 Würmer im Caecum

nachgewiesen. Dies entspricht einer Reduktion der Wurmlast im Vergleich zu den Infektionskontrollen (Gruppe 1) von 85%. Tier Nr. 17 verstarb während der Behandlung aus unerklärlichen Gründen und wurde in der Statistik nicht berücksichtigt. Bei der Nekropsie wurden in dieser Gruppe erstmals tote Nematoden im Darminhalt der Tiere (Nr. 16, 19) angetroffen. Die 1x Behandlung mit einer Dosis von 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil reduzierte die Wurmlast der Versuchsgruppe 3 im Mittel um 76%. Es wurden bei allen Versuchstieren tote Nematoden im Darminhalt angetroffen. Bei einer Dosis von 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil konnte die Anzahl der *T. muris*-Nematoden bei der Versuchstiergruppe 2 im Mittel um 67,5% vermindert werden. Hier wurden bei Gerbil Nr. 2 zwei tote Würmer im Darminhalt angetroffen.

4. Ergebnisse

Tab. 4.18: Anzahl der im Caecum angetroffenen *Trichuris muris*-Nematoden und deren Status nach Behandlung der Versuchstiergruppen 2-6 mit unterschiedlichen Dosen des Extrakts CHLO_1.

I.i.E = Lose im Epithel sitzend, k. A. = keine Angaben

Versuchsgruppe	Gerbil Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW]	Entsprechende Menge Trockengewicht [g/kg KGW]	Anzahl ♀	Anzahl ♂	Anzahl <i>T. muris</i> gesamt	Reduktion-rate $\bar{x}_1 - \bar{x}_n$ [%]	Beobachtung
1	1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle	30	85	115	$\bar{x} = 115,2$ = 0%	Alle fest im Epithel
	2			37	113	150		
	3			21	78	99		
	4			29	72	101		
	5			40	71	111		
2	6	0,2	32	12	25	37	$\bar{x} = 37,4$ 67,5%	5♂+7♀ I. i. E.
	7			14	20	35		3♂+10♀ I. i. E.
	8			15	25	40		5♂+8♀ I. i. E.
	9			13	29	42		4♂+6♀ I. i. E.
3	10	0,4	64	11	22	33	$\bar{x} = 27,6$ 76%	2♂+3♀ I. i. E.; 2 tot
	11			15	34	49		9♂+10♀ I. i. E.; 8 tot
	12			5	19	24		11♂+4♀ I. i. E.; 2 tot
	13			7	6	13		6♂+2♀ I. i. E.; 4 tot
4	14	2,0	320	10	18	28	$\bar{x} = 17,3$ 85%	12♂+4♀ I. i. E.
	15			17	7	24		5♂+8♀ I. i. E.; 6 tot
	16			10	5	15		10♂+3♀ I. i. E.; 2 tot
	17			k.A.	k.A.	k.A.		k.A.
5	18	4,0	640	10	8	18	$\bar{x} = 9,8$ 91,5%	6♂+6♀ I. i. E.
	19			5	17	22		13♂+2♀ I. i. E.; 3 tot
	20			5	9	14		5♂+4♀ I. i. E.
6	21	6,0	940	1	9	10	$\bar{x} = 1,3$ 98,9%	Alle lose im Epithel
	22			12	4	16		
	23			1	3	4		
6	24	6,0	940	3	5	8	$\bar{x} = 1,3$ 98,9%	Alle lose im Epithel
	25			5	6	11		
	26			-	1	1		
6	27	6,0	940	-	2	2	$\bar{x} = 1,3$ 98,9%	Alle lose im Epithel
	28			-	1	1		

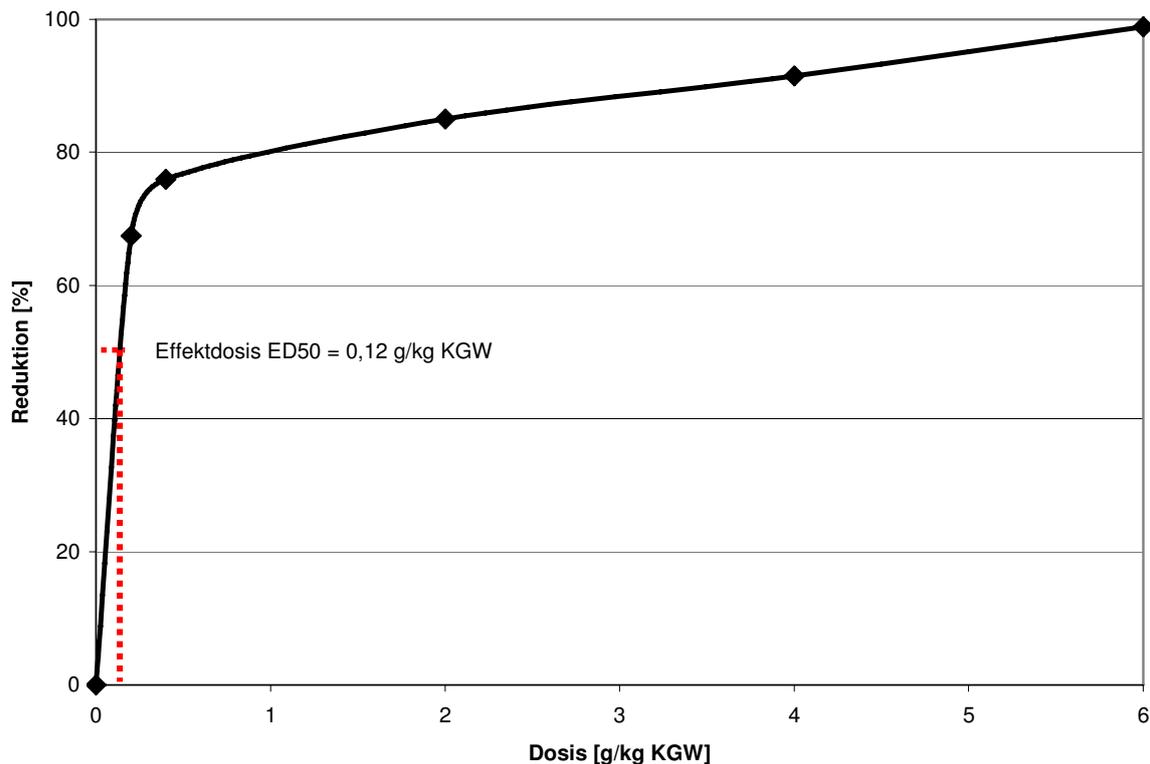


Abb. 4.17.: Dosis-Wirkungskurve von mit unterschiedlichen Dosierungen des CHLO_1 Extrakts behandelte Gerbils (Versuchsgruppen 1-6). Eine mittlere Effektdosis ED50 von 0,12 g/kg KGW Gerbils führt bei 50% der infizierten Tiere zu einer Reduktion.

Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4.17.) zeigt deutlich einen exponentiellen Anstieg der Wirkung bei zunehmender Dosismenge. Dabei wird eine Wirkung von etwa 50% schon bei einer Konzentration von 0,12 g CHLO_1 erreicht. Um eine knapp 80%ige Reduktion der Wurmlast zu erzielen, ist eine relativ geringe Konzentration im Bereich von 0,5 g CHLO_1 notwendig. Eine 100%-ige Entfernung aller Würmer ist laut der erzielten Ergebnisse nur mit sehr hohen Konzentrationen von mehr als 6 g CHLO_1/kg KGW Gerbil möglich.

4.5.6. Aktivitätsüberprüfung auf die Larven von *T. muris*

Die Behandlung zweier infizierter Gerbils Nr. 2 und 3 am Tag 3 p.i. mit einer Dosis von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil zeigte bei der Überprüfung der Eiausscheidung an den Tagen 45, 47 und 48 p.i. keinen signifikanten Unterschied zu der unbehandelten Infektionskontrolle Nr. 1. Die zum Zeitpunkt der Applikation (Lee and Wright, 1978) fest im Epithel sitzenden Larven von *T. muris* konnten somit nicht abgetötet werden. Bei der Sektion der Versuchstiere am Tag 50 p.i. wurden bei den Gerbils Nr. 2 und 3 24% bzw. 16% weniger Nematoden gefunden als bei der Infektionskontrolle Nr. 1 (Tab. 4.20.).

Tab. 4.19.: Anzahl der an den Tagen 45, 47 und 49 p.i. aufgefundenen Eier nach einer Behandlung von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil am Tag 3 p.i.

Gerbil Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW Gerbil]	Trockengewicht [g/kg KGW Gerbil]	Eizahl/g Fäzes		
			Tag 45 p.i.	Tag 47 p.i.	Tag 49 p.i.
1	-	-	97678	89965	112341
2	6,0	940	71001	68900	66532
3	6,0	940	87332	69984	83221

Tab. 4.20.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 50 p.i. gefundenen weiblichen und männlichen Exemplare von *T. muris* bei der unbehandelten Infektionskontrolle Nr. 1 und bei den mit 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil behandelten Versuchstiere Nr. 2 und 3

Tier Nr.	Wurmzahl Tag 50 p.i.		
	♀	♂	gesamt
1	54	37	91
2	36	33	69
3	47	29	76

Reduktion bezogen auf das Kontrolltier:

Reduktion bei Gerbil Nr. 2 = 24%

Reduktion bei Gerbil Nr. 3 = 16%

4.5.7. Aktivitätsüberprüfung von α -Monolaurin

4.5.7.1. In-vitro-Versuch

Die Überprüfung der bei der Gaschromatographie detektierten Substanz α -Monolaurin in einem in-vitro-Assay zeigte auch nach mehr als 8 Stunden bei einer Konzentration von 1 mg/Well keinen Effekt auf die Nematoden.

Tab. 4.21.: Überprüfung der biologischen Aktivität von α -Monolaurin auf *Trichuris muris*.

NB = normale Beweglichkeit, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8	T = 12
Kontrolle	NB							
α -Monolaurin	NB							

4.5.7.2. In-vivo-Versuch

Bei der Aktivitätsüberprüfung von α -Monolaurin zeigte sich wie in dem zuvor durchgeführten in-vitro-Versuch keinerlei anthelminthische Wirkung bei den Versuchstieren Nr. 2 und 3. Die anfänglich erniedrigte Eizahl beim Versuchstier Nr. 2 nach der Behandlung mit 1,6 g reinem α -Monolaurin/kg KGW Gerbil am Tag 47 p.i. wuchs wieder auf den Anfangswert von etwa

100.000 Eier/g Fäzes an. Auch eine 100fach höhere Dosis von 16 g/kg KGW Gerbil erzielte keine Reduktion der Eizahl. Eine Sektion der Tiere wurde aufgrund des fehlenden Behandlungserfolgs nicht durchgeführt.

Tab. 4.22.: Anzahl der bei der Kotuntersuchung angetroffenen Eier nach einer Behandlung mit 1,6 und 16 g α -Monolaurin/kg KGW Gerbil am Tag 47 p.i.

Tier Nr.	Tag p.i.					
	46	47	50	51	52	53
1	68702	81633	90772	98413	70778	93320
2	101579	111888	98745	89498	87878	100332
3	68945	97445	93154	69692	100334	66911

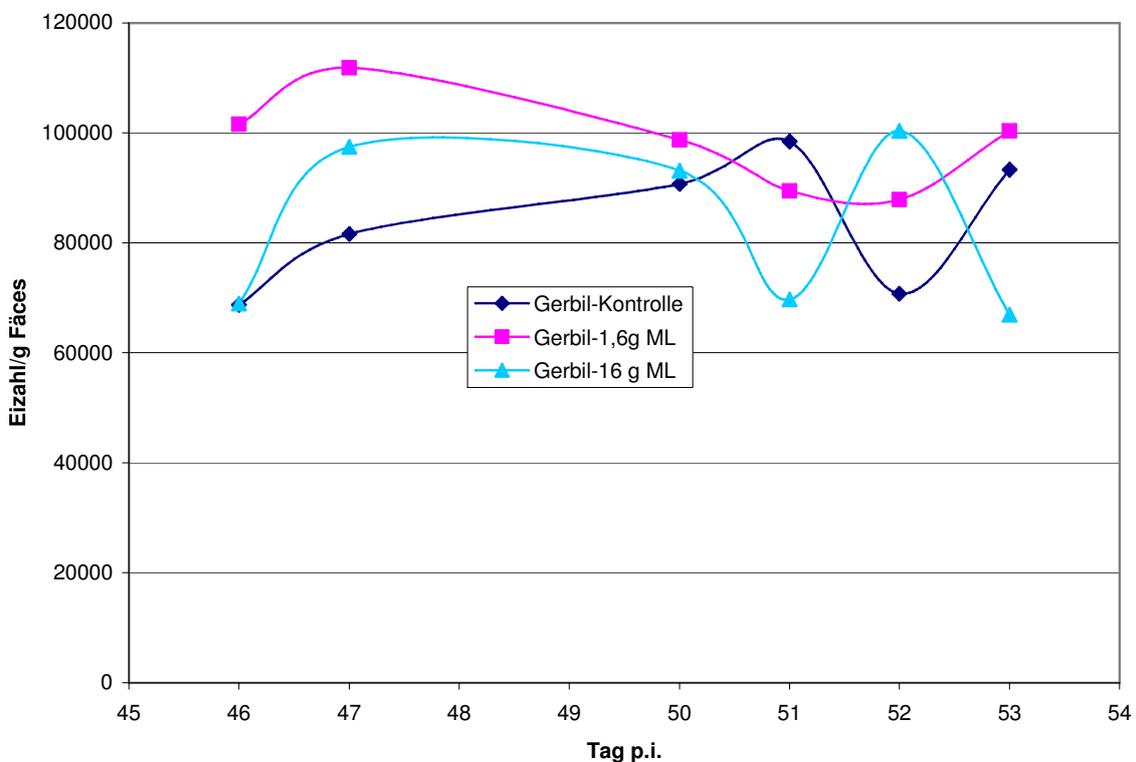


Abb. 4.18.: Eiausscheidung nach Behandlung der Gerbils Nr. 2 und 3 mit 1,6 bzw. 16 g α -Monolaurin /kg KGW Gerbil am Tag 47 p.i. Gerbil Nr. 1 diente als Kontrolltier.

4.5.8. Aktivitätsüberprüfung von o- Hydroxybiphenyl (2-Phenylphenol)

4.5.8.1. In-vitro-Versuch

Die Überprüfung der bei der Gaschromatographie als o-Hydroxybiphenyl detektierten Substanz zeigte bereits nach 2 h mit einer Dosis von 1 mg/Well eine deutliche Aktivität auf die inkubierten Nematoden. Nach 3 h waren alle Würmer in diesem Ansatz tot.

Tab. 4.23.: Überprüfung der biologischen Aktivität von o-Hydroxybiphenyl auf *Trichuris muris*.

NB = normale Beweglichkeit, langsam = langsame, zuckende Bewegungen, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1	T = 2	T = 3
Kontrolle	NB	NB	NB	NB
o-Hydroxybiphenyl	NB	NB	Langsam bis M	tot

4.5.8.2. In-vivo-Versuch

Zur Überprüfung der in den in-vitro-Tests festgestellten Wirksamkeit auf die Nematoden, wurde ebenfalls ein Versuchsergil mit o-Hydroxybiphenyl (syn. 2-Phenylphenol) behandelt. Dabei konnte das in den in-vitro-Versuchen gewonnene Ergebnis bestätigt werden. Nach einer einmaligen Behandlung mit 0,16 g/kg KGW Gerbil am Tag 47 p.i. konnte die Eiausscheidung nach 72 h auf Null reduziert werden (Tab. 4.24.), was einer Reduktion von 100 % entspricht. Bei der Sektion des behandelten Versuchstieres am Tag 53 p.i. befanden sich aber noch 4 männliche *T. muris*-Nematoden im Darm (Tab. 4.25.), die unbeweglich und milchig trüb erschienen.

Tab. 4.24.: Anzahl der bei der Kotuntersuchung aufgefundenen Eier nach einer Behandlung von 0,16 g o-Hydroxybiphenyl/kg KGW Gerbil am Tag 47 p.i.

Tier Nr.	Tag p.i.					
	46	47	50	51	52	53
1	68702	81633	90772	98413	70778	93320
2	87665	71943	98652	1208	0	0

Tab. 4.25.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 55 p.i. gefundenen weiblichen und männlichen Exemplaren von *T. muris*.

Tier Nr.	♂	♀
2 (o-Hydroxybiphenyl)	4	0

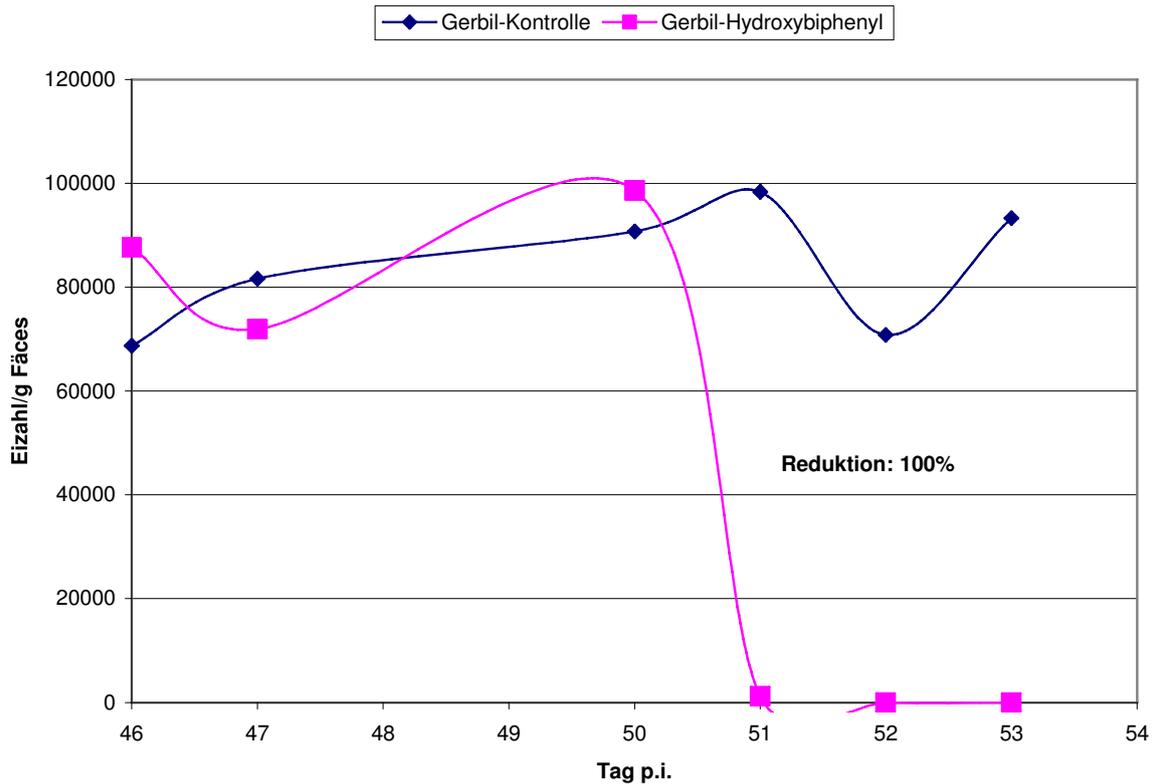


Abb. 4.19.: Eiausscheidung nach Behandlung von Gerbil Nr. 2 mit 0,16 g o-Hydroxybiphenyl am Tag 47 p.i. Gerbil Nr. 1 diente als Infektionskontrolle.

4.6. In-vivo-Behandlungsversuche von unterschiedlichen Parasitenspezies

4.6.1. Wirkung auf *Hymenolepis microstoma*

Die Sektion der unbehandelten Infektionskontrollen Nr. 1 und 2 am Tag 27 p.i. zeigte 8 bzw. 12 Cestoden in den Gallengängen. Bei beiden Tieren konnte eine große Anzahl an Eiern in den Fäzes beobachtet werden. Bei der Eröffnung der Tiere befanden sich im gesamten Darm kleine, weiße Proglottidenstücke. Nach der Behandlung der beiden Versuchstiere Nr. 9 und 20 mit einer Dosis von 200 mg CHLO₁/kg KGW Maus am Tag 25 p.i. wurden 24 h nach der Applikation ca. 1 cm lange, weiße Proglottiden-Stücke im Kot aufgefunden. Nach 48 h schieden beide Tiere keine Eier mehr aus. Bei der Sektion der Versuchstiere Nr. 9 und 10 wurden 9 bzw. 11 Cestoden (Tab. 4.26.) in den Gallengängen gefunden. Alle Cestoden waren voll bewegungsfähig, zeigten jedoch bezüglich der Länge einen deutlichen Unterschied zu den Kontrollwürmern (vergleiche Abb. 39, 40). Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung konnte beobachtet werden, dass die Cestoden der behandelten Tiere wesentlich kürzer waren als die der Kontrolltiere. Sie besaßen zudem keine reifen Proglottiden mehr, es fehlte somit der mit reifen Eiern gefüllte darmständige Teil bei allen behandelten Cestoden (vergleiche Abb. 40). Bei der Eröffnung von Tier Nr. 8 nach 48 h

wurden noch 11 Cestoden in den Gallengängen angetroffen. Auch hier waren alle *H. microstoma* voll bewegungsfähig und zeigten dasselbe morphologische Bild wie die Cestoden der behandelten Versuchsmäuse Nr. 9 + 10. Es wurden aber keine Eier mit den Fäzes ausgeschieden, und im Darm des Tieres wurden keine Proglottiden-Stücke gefunden. Bei den Tieren Nr. 3, 4, 5, 6 und 7 (Tab.4.26.) wurde nur der Kot nach 48 h auf Eier hin untersucht. Bei den Tieren Nr. 7, 6 und 3 konnten keine, bei den Tieren Nr. 4 und 5 noch vereinzelte Eier in den Fäzes festgestellt werden. Eine Sektion der Versuchstiere Nr. 3 bis 7 wurde nicht durchgeführt, da sich bereits bei hohen Dosierungen kein Behandlungserfolg zeigte.

Tab. 4.26.: Behandlung von mit *Hymenolepis microstoma* infizierter NMRI-Mäuse mit verschiedenen Dosen des Extrakts CHLO_1.

- Alle Versuchstiere wurden am Tag 25 p.i. mit bestimmten Dosen des Extrakts CHLO_1 behandelt.
- Nach 24 und 48 h wurde der Kot der Tiere auf Eier hin untersucht
- ++ sehr viele Eier, + wenige Eier, - keine Eier, k. A keine Angaben (Sektion nicht durchgeführt)
- Sektion der Mäuse nach 48 h

Tier Nr.	Dosis CHLO_1 [mg/kg KGW Maus]	Befund Eier im Fäzes		Recovery Cestoden (48 h)
		24 h	48 h	
1	Kontrolle	++	++	8
2	Kontrolle	++	++	12
3	10	k. A	-	k. A
4	10	k. A	+	k. A
5	20	k. A	+	k. A
6	20	k. A	-	k. A
7	100	k. A	-	k. A
8	100	k. A	-	11
9	200	-	-	9
10	200	-	-	11

4.6.2. Wirkung auf *Hymenolepis diminuta*

Einen Tag nach der 1. Behandlung am Tag 24 p.i. schieden alle Versuchstiere im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren unverändert viele Eier mit dem Kot aus. Bereits einen Tag nach der 2. Behandlung der beiden Versuchsratten Nr. 7 und 8 mit einer Dosis von 0,6 g CHLO_1/Tag konnten keine Eier mehr im Kot festgestellt werden. In den Fäzes der Versuchstiere Nr. 5 und 6 waren noch sehr wenige, meist jedoch unreife Eier vorhanden. Die Ratten Nr. 3 und 4 schieden etwas weniger Eier aus als die Infektionskontrollen Nr. 1 und 2. Bei der Untersuchung der Fäzes am Tag 28 p.i. nach der 3. Behandlung konnte bei keinem

der behandelten Versuchstiere Nr. 3-8 noch Eier beobachtet werden. Die Sektion aller Versuchstiere 10 Tage nach der 1. Behandlung erbrachte bei den Infektionskontrollen jeweils 3 adulte Cestoden im Darm (Tab. 4.27.). Im Vergleich dazu wurden bei den Versuchsratten Nr. 3 und 4 jeweils 2 bzw. 3 Cestoden gefunden, die jedoch in der Gesamtlänge erheblich kürzer erschienen (Abb. 39, 40). Alle Würmer waren voll beweglich und zeigten keine äußeren Schäden, der gesamte hintere Teil mit den reifen Proglottiden fehlte jedoch. Bei der Sektion der Ratten Nr. 5, 6, 7 und 8 wurden keine Bandwürmer mehr angetroffen.

Tab. 4.27.: Behandlung der mit *H. diminuta* infizierten Wistar-Ratten mit unterschiedlichen Konzentrationen des Extrakts CHLO_1.

- Alle Versuchstiere wurden an den Tagen 23, 25 und 27 p.i. mit unterschiedlichen Konzentrationen des Extrakts CHLO_1 behandelt.
- Der Kot der Tiere wurde an den Tagen 24, 26 und 28 p.i. auf Eier hin untersucht.
- 10 Tage nach der Behandlung wurden alle Tiere seziiert.
- +++ = unverändert viele Eier, ++ = wenige Eier, + = vereinzelte Eier, - = keine Eier

Ratte Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW]/Tag	Trockengewicht [g/kg KGW]/Tag	Anzahl Eier im Kot			Anzahl Cestoden 33 p.i.
			24 p.i.	26 p.i.	28 p.i.	
1	0	0	+++	+++	+++	3
2	0	0	+++	+++	+++	3
3	0,1	16	+++	++	-	2
4	0,1	16	+++	++	-	3
5	0,4	64	+++	+	-	-
6	0,4	64	+++	+	-	-
7	0,6	94	+++	-	-	-
8	0,6	94	+++	-	-	-

4.6.3. Wirkung auf *Fasciola hepatica*

Die Behandlung zweier Wistar-Ratten mit einer fünftägigen Gabe des Extrakts CHLO_1 von je 3,8 g erzielte keinerlei Verringerung der Eizahl in den Fäzes. Es konnte bei keiner Ratte ein Unterschied der Eiausscheidung vor und nach der oralen Gabe des Extrakts festgestellt werden. Aufgrund der offenbar nicht vorhandenen Wirkung auf die adulten *Fasciola hepatica*-Trematoden wurde davon abgesehen, die Versuchstiere zu töten und zu eröffnen.

4.6.4. Wirkung auf *Echinostoma caproni*

Die Eiausscheidungsrate beider Versuchstiere - sowohl der Infektionskontrolle, als auch der behandelten Maus - erwies sich als sehr instabil. Man konnte bei beiden Tieren enorme Schwankungen in der Anzahl der täglich zu einem bestimmten Zeitpunkt ausgeschiedenen Eier feststellen (Abb. 4.20.). Nach einer 5 tägigen Behandlung mit jeweils einer Dosis von 0,4 g CHLO_1/kg KGW Maus pro Tag konnte die Anzahl der ausgeschiedenen Eier beim behandelten Versuchstier Nr. 2 nicht reduziert werden. Die Ausscheidungsrate lag bei dieser Versuchsmaus am Ende des Experiments am Tag 49 p.i. bei 16 109 Eiern/g Fäzes. Dieser Wert lag erheblich höher, als der Anfangswert von 1 200 Eiern/g Fäzes am Tag 35 p.i (Tab. 4.28.). Bei der Sektion beider Balb/c-Mäuse am Tag 50 p.i. wurden beim Kontrolltier 8, beim behandelten Tier Nr. 2 7 adulte Trematoden im Darm angetroffen (Tab. 4.29.).

Tab. 4.28.: Anzahl der ausgeschiedenen Eier nach einer mehrtägigen Behandlung an den Tagen 39, 40, 42, 46 und 47 p.i. mit jeweils einer Dosis von 0,4 g CHLO_1/kg KGW Maus. Maus Nr. 1 diente als Infektionskontrolle und erhielt keinerlei Behandlung.

Maus Nr.	Anzahl Eier/g Fäzes											
	35 p.i.	36 p.i.	38 p.i.	39 p.i.	40 p.i.	41 p.i.	42 p.i.	45 p.i.	46 p.i.	47 p.i.	48 p.i.	49 p.i.
1	2650	3345	26001	11658	2972	4577	24019	11265	5509	6293	14456	3652
2	1200	14297	7514	9091	8849	17126	26761	6354	3229	9259	2180	16109

Tab. 4.29.: Anzahl der bei der Sektion am Tag 50 p.i. im Darm der Versuchstiere angetroffenen *Echinostoma caproni*-Würmern.

Maus Nr.	Adulte <i>E. caproni</i>
1	8
2	7

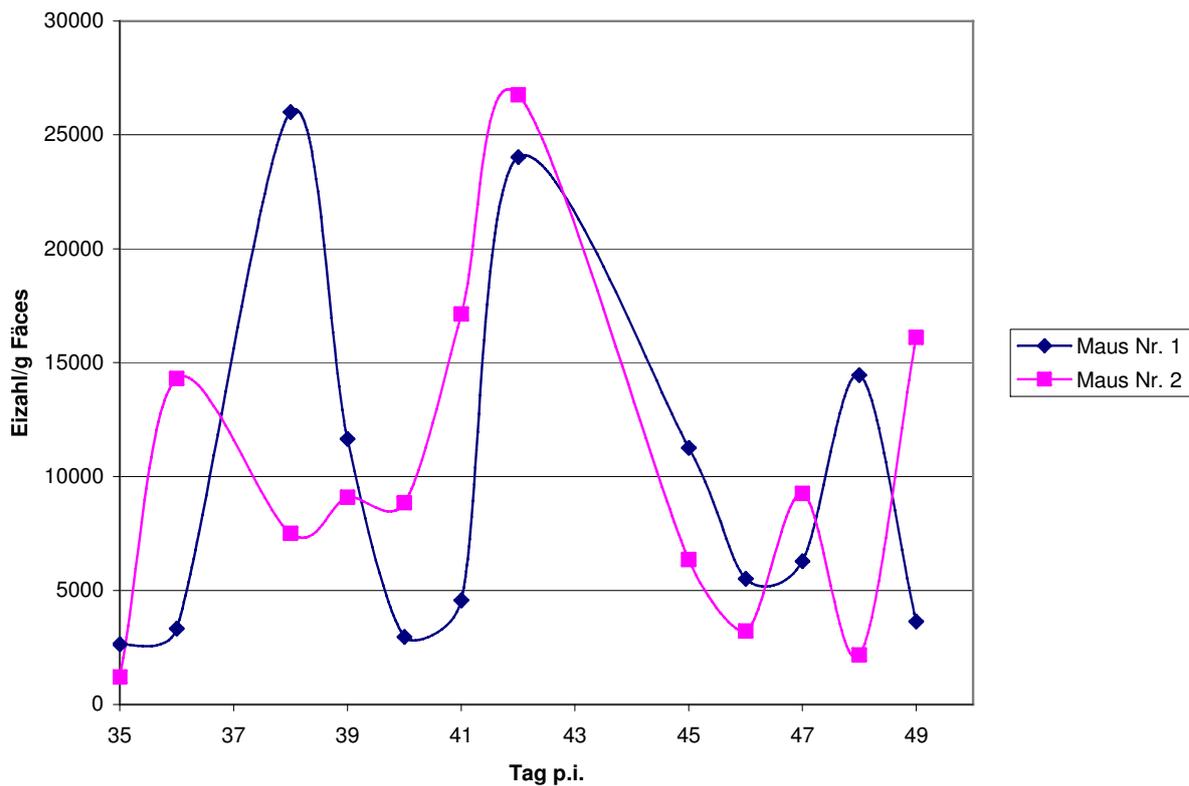


Abb. 4.20.: Anzahl der ausgeschiedenen Eier nach einer mehrtägigen Behandlung an den Tagen 39, 40, 42, 46 und 47 p.i. mit jeweils einer Dosis von 0,4 g CHLO_1/kg KGW Maus. Maus Nr. 1 diente als Infektionskontrolle und erhielt keinerlei Behandlung.

4.6.5. Wirkung auf *Angiostrongylus cantonensis*

Die Untersuchung der Fäzes der mit einer Dosis von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Ratte behandelten Versuchstiere P02 und P03 zeigten nach der 1. Behandlung am Tag 52 p.i. eine leichte Erhöhung der im Kot vorhandenen Larven im Vergleich zu den zuvor gewonnenen Fäzesproben. Es konnten erstmals tote Larven im Kot beobachtet werden. Nach der 2. Behandlung am Tag 53 p.i. stieg die Zahl der toten Larven bei beiden Tieren auf 35-40% an, gleichzeitig sank die Zahl der im Kot aufgefundenen lebenden Larven. Nach der 3. Behandlung am Tag 54 p.i. stieg die Zahl der toten Larven im Kot auf 67% bzw. 58% an. Auch die Zahl der mit den Fäzes ausgeschiedenen lebenden Larven stieg wieder auf Werte, die höher als die Anfangswerte lagen, an. Der Vergleich der gewonnenen Daten vor und nach der Behandlung erbrachte scheinbar keinen Behandlungserfolg bezogen auf die in den Pulmonalarterien lebenden Adultwürmer. Lediglich im Darm befindliche L1-Larven zeigten eine Sensibilität auf den Wirkstoff. Diese Erkenntnis konnte auch bei den in Kap. 4.4. durchgeführten in-vitro-Tests bestätigt werden. Aufgrund des nicht erzielten Behandlungserfolgs wurden die Versuchsratten nicht seziiert.

4. Ergebnisse

Tab. 4.30.: Anzahl der nach der Behandlung mit 6,0 g CHLO_1/kg KGW Ratte an den Tagen 52, 53 und 54 p.i. in den Fäzes angetroffenen Larven

Ratte Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW Ratte]	Tag	Anzahl tote L1 [%]	Tag	Anzahl tote L1 [%]		Anzahl tote L1 [%]		Anzahl tote L1 [%]
		52 p.i.		53 p.i.		54 p.i.		56 p.i.	
P01	Kontrolle	6558	-		-	5622	-	7631	-
P02	6,0	8457	-	8798	12	3004	40	14408	67
P03	6,0	2450	-	4100	9	1200	35	5700	58

4.6.6. Wirkung auf *Toxocara cati*

Bei der 5x Behandlung einer mit *Toxocara cati* infizierten Katze konnte erst nach der 4. Behandlung mit jeweils 6 ml Kokoswasser/Tag bei der Kotuntersuchung am 29.11.2003 eine deutliche Reduktion der *Toxocara*-Eier im Kot der Katze festgestellt werden (Tab. 4.31.). Nach der 5. Behandlung mit weiteren 6 ml am Tag 29.11.03 wurden bei der Kotuntersuchung am 1.12. 03 keine Eier mehr im Kot des Versuchstieres gefunden. Auch bei der folgenden Kotuntersuchung am Tag 2.12.03 wurden keine Eier mehr in den Fäzes beobachtet.

Tab. 4.31.: Behandlung einer mit *Toxocara cati* infizierten Katze mit Kokoswasser

- Das Versuchstier wurde an den Tagen 25.11.-29.11.2003 mit jeweils 6 ml Kokoswasser/Tag behandelt.
- Die Anzahl der Eier wurde als Eizahl/g Fäzes bestimmt.

Katze	Behandlung	18.11.03	24.11.03	25.11.03	29.11.03	1.12.03	2.12.03
Tico	5 x 6 ml Kokoswasser/Tag	356	277	364	56	0	0

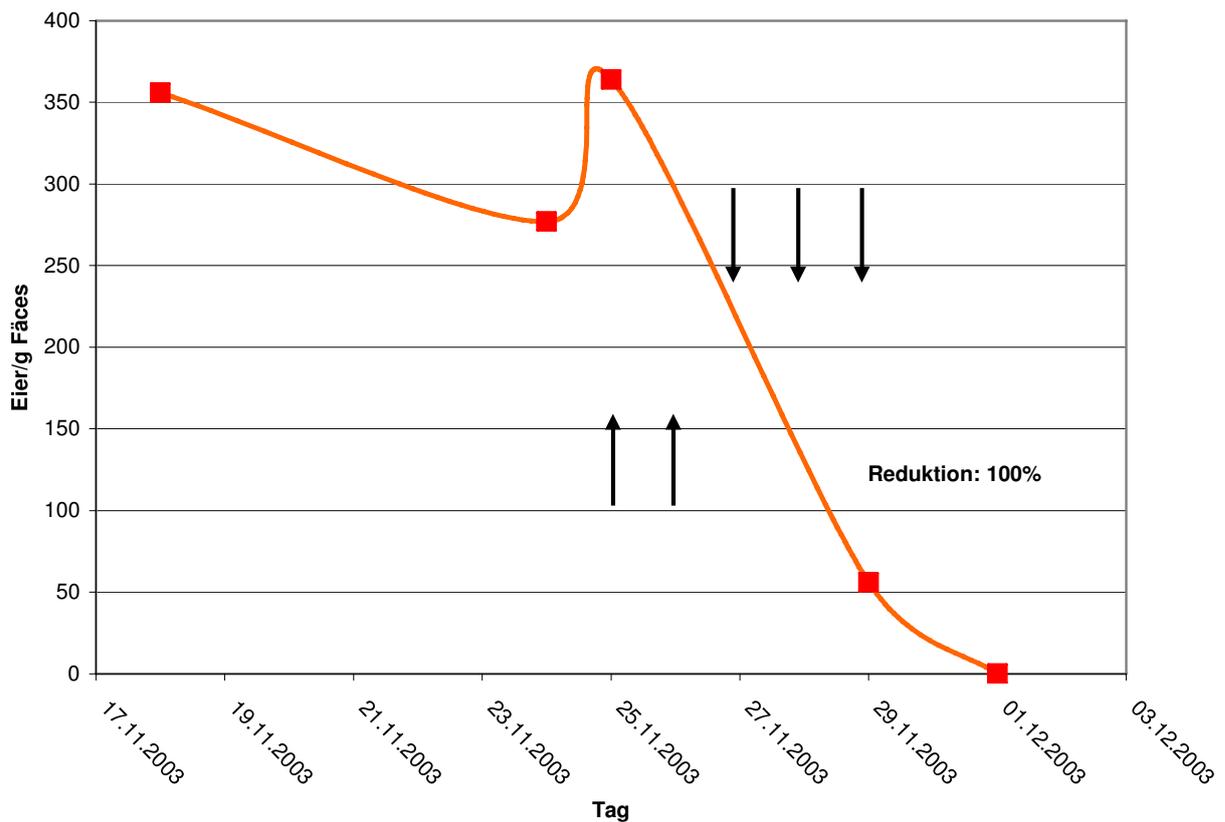


Abb. 4.21.: Eiausscheidung nach Behandlung einer mit *Toxocara cati* infizierten Katzen mit einer Dosis von 6 ml Kokoswasser/Tag an den Tagen 25.11.-29.11.2003 (Pfeile).

4.6.7. Wirkung auf *Taenia taeniaeformis*

Die ausschließliche Untersuchung bei den mit *Taenia taeniaeformis* infizierten Katzen auf reife Eier im Kot stellte sich als sehr ungenau heraus. Daher wurde ein Behandlungserfolg- bzw. Nichterfolg anhand des Auftretens bzw. Nichtauftretens von Proglottiden am After der Tiere bewertet. Bei beiden Tieren konnten vom Tag nach der 1. Behandlung keine Proglottiden mehr beobachtet werden. An den Tagen nach der 2. und 3. Behandlung schieden beide Tiere im Vergleich zu den Beobachtungen vor der Behandlung vermehrt Proglottiden aus. Bei Tier Nr. 1 konnten nach der 4. Behandlung keine Wurmstücke mehr am After festgestellt werden. Katze Nr. 2 war erst ab der 5. Behandlung wurmfrei (Tab. 4.32.). Beide Katzen schieden auch nach einer mehrwöchigen Kontrolle keine Proglottiden mehr aus.

Tab. 4.32.: Behandlung von mit *Taenia taeniaeformis* infizierten Katzen mit Kokoswasser

- Die Versuchstiere wurden an den Tagen 23.04.04-27.04.04 mit jeweils 6 ml Kokoswasser/Tag behandelt.
- Die Anzahl der ausgetretenen Proglottiden: ++ = viele, + = wenige, - = keine

Katze	Behandlung	23.10.04	24.10.04	25.10.04	26.10.04	27.10.04	28.10.04
Kimba	5 x 6 ml Kokoswasser/Tag	+	-	++	+	+	-
Tico	5 x 6 ml Kokoswasser/Tag	+	-	++	++	-	-

4.6.8. Wirkung auf *Trichomonas muris*

Bei der Sektion der mit unterschiedlichen Konzentrationen des Extrakts CHLO_1 behandelten Gerbils (Kap. 4.5.5.) zeigten alle Versuchstiere bei der mikroskopischen Untersuchung des Blinddarms einen Befall mit Trichomonaden. Auch bei den Tieren Nr. 26, 27 und 28, die mit einer Dosis von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil (940 g Trockengewicht/kg KGW) behandelt worden waren, konnte ein verbliebener starker Befall mit Trichomonaden im Vergleich zu den unbehandelten Infektionskontrollen Nr. 1-5 beobachtet werden (Abb. 4.22.).

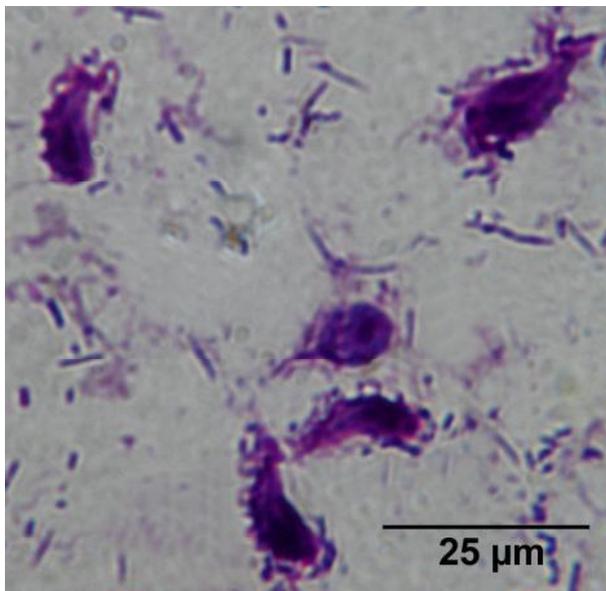


Abb. 4.22.: Blinddarm-Abstrich aus einem mit 6,0 g CHLO_1 behandelten Gerbil. Die Trichomonaden wurden mit einer Methylenblau-Färbung sichtbar gemacht.

4.5.9. Wirkung auf *Eimeria papillata*

Die an zwei aufeinander folgenden Tagen mit einer Dosis von je 0,8 g CHLO_1/kg KGW Maus (128 g Trockengewicht/kg KGW) behandelten Tiere Nr. 2 und 3 zeigten beginnend mit der Kotprobe am Tag 5 keine Veränderung in der Oocystenausscheidung im Vergleich zum

Kontrolltier Nr. 1. Bei allen Versuchstieren konnte eine gleichbleibend hohe Ausscheidung beobachtet werden (Tab. 4.33.).

Tab. 4.33.: Oocystenausscheidungsrate einer mit *E. papillata* infizierten Maus nach 2maliger Behandlung mit CHLO_1.

- Anzahl der Oocysten in den Fäzes: +++ = sehr hoch, ++ = hoch, + wenig, - = keine

Maus Nr.	Dosis CHLO_1 [g/kg KGW Maus]	Trockengewicht [g/kg KGW Maus]	Anzahl Oocysten im Fäzes ab Tag 5 p.i.
1	Infektionskontrolle	Infektionskontrolle	+++
2	0,8 g /Tag	128	+++
3	0,8 g /Tag	128	+++

4.7. In-vitro-Behandlungsversuche von unterschiedlichen Parasitenspezies

4.7.1. Aktivitätsüberprüfung bei *Hymenolepis microstoma*

Alle in 1 mg der Fraktion 4 (Kap. 4.2.4.3.) inkubierten Cestoden zeigten bei Inokulation der Würmer in das vorbereitete Well noch das normale, mit den Kontrollwürmern vergleichbare Bewegungsmuster. Nach etwa 15 min traten dann aber starke Zuckungen und krampfartige Bewegungen vor allem im Kopfbereich auf. Nach weiteren 15 min waren alle Bandwürmer tot. Als Besonderheit konnte hier bei den behandelten Cestoden beobachtet werden, dass sich die Proglottiden an den dafür vorgesehenen Abschnürungsstellen vom Rest des Wurmkörpers trennten oder an diesen Stellen stark eingeschnürt erschienen. Die Kontrollwürmer blieben bis zum Abbruch des Experiments über mehr als 6 h voll bewegungsfähig.

Tab. 4.34.: In-vitro-Assay zur Überprüfung der Aktivität der Fraktion 4 auf *Hymenolepis microstoma*
NB = normale Beweglichkeit, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1/4	T = 1/2	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8
Kontrolle	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 4	NB	M	tot	-	-	-	-	-	-

4.7.2. Aktivitätsüberprüfung bei *Fasciola hepatica*

Im Vergleich zu den Kontrollwürmern konnten bei den mit 1 mg der als aktiv getesteten Fraktion 4 inkubierten Trematoden gleich zu Anfang starke Zuckungen und

Lähmungserscheinungen beobachtet werden. Nach etwa 30 Minuten zeigte sich jedoch ein zu den Kontrollwürmern identisches Verhalten. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden konnte bei den mit dem Wirkstoff inkubierten Tieren eine starke Abnahme der Bewegungsfähigkeit beobachtet werden, nach 4 Stunden waren alle Tiere tot (Tab. 4.35.). Die Kontrolltiere zeigten aber während der gesamten Versuchsdauer von 8 Stunden eine gleichbleibende Bewegungsfähigkeit.

Tab. 4.35.: In-vitro-Assay zur Überprüfung der Aktivität der Fraktion 4 auf die Trematodenart *Fasciola hepatica*

NB = normale Beweglichkeit, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1/2	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8
Kontrolle	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 4	M	NB	NB	NB	M	tot	-	-

4.7.3. Aktivitätsüberprüfung bei *Echinostoma caproni*

Die in 1 mg der Fraktion 4 inkubierten Exemplaren von *E. caproni* zeigten gleich zu Anfang leichte Zuckungen, die sich aber nach ca. 1/2 h wieder normalisierten. Nach 3 h konnte bei allen behandelten Würmern eine leichte Lähmung beobachtet werden, nach einer weiteren Stunde waren alle Trematoden in diesem Ansatz tot. Hingegen zeigten alle Trematoden des Kontrollansatzes über mehr als 6 h volle Bewegungsfähigkeit (Tab. 4.36).

Tab. 4.36.: In-vitro-Assay zur Überprüfung der Aktivität der Fraktion 4 auf die Trematodenart *Echinostoma caproni*

NB = normale Beweglichkeit, M = motil, Reaktion auf Berührungsreiz, T = Inkubationszeit [h]

Ansatz	T = 0	T = 1/2	T = 1	T = 2	T = 3	T = 4	T = 6	T = 8
Kontrolle	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Fraktion 4	M	NB	NB	NB	M	tot	-	-

4.8. Morphologische Untersuchungen am Parasitenmodell *Trichuris muris*

4.8.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen der Totalpräparate

Kontrolle

Bei allen männlichen *T. muris*- Nematoden war das Hinterende stets eingerollt. Dadurch ließen sie sich leicht von den Weibchen unterscheiden (Abb. 1). Der Hodenschlauch erschien leicht gewunden und nahm, neben dem Darm, den gesamten Querschnitt des Wurms ein (Abb. 7). Das für die Männchen typische, dunkelbraune Spiculum saß in einer Spiculumscheide, die nach außen führte und mit kleinen Häkchen besetzt war (Abb. 87). Die weiblichen *Trichuris muris* waren etwas größer und breiter und besaßen ein leicht abgerundetes Hinterende (Abb. 86). Die Vagina mündete etwa im hinteren Drittel des Wurms. Bei allen Tieren war der Uterus prall gefüllt mit reifen, braunen Eiern (Abb. 10). Das Ovar enthielt zahlreiche, dicht an dicht liegenden Oozyten unterschiedlicher Entwicklungsstufen (Abb. 11).

Dosis 0,2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Bei den männlichen Nematoden zeigte sich eine Schrumpfung des Hodenschlauchs um etwa 1/3 des Durchmessers (Abb. 8). An einigen Stellen konnten kleine Deformationen der Hodenschlauchoberfläche beobachtet werden. Bei den weiblichen Würmern bildeten sich kleine Hohlräume zwischen den Oozyten (Abb. 12). Die Eier im Uterus lagen teilweise frei - ohne Wandkontakt.

Dosis 0,4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Auch hier erschien der Hodenschlauch in seinem Durchmesser wesentlich kleiner als bei den Kontrollwürmern. Im Vergleich zu der niedrigeren Dosierung von 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil zeigten sich vermehrt Deformationen der Hodenschlauchoberfläche. Auch in den Keimzonen der Weibchen bildeten sich an mehreren Stellen Zwischenräume. Bei vielen Nematoden zeigten sich Deformationen bzw. Unebenheiten in der Oberflächenstruktur des Ovars. Im Uterus befanden sich sehr wenige reife Eier.

Dosis 2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Bei beiden Geschlechtern nahmen die Oberflächendeformationen an Hodenschlauch und Uterus bzw. Ovar stark zu. Der Hodenschlauch war auf etwa die Hälfte seines Volumens geschrumpft und erschien in seiner Oberflächenstruktur sehr uneben. Die Oozyten und die Eier lagen bei vielen Weibchen frei, ohne Wandkontakt im Uterus bzw. im Ovar (Abb. 13).

Dosis 4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Die gefundenen Nematoden waren stark bewegungseingeschränkt und erschienen leicht milchig-trüb. Der Hodenschlauch war bei den Männchen auf etwa 1/3 seines Durchmessers geschrumpft (Abb. 9). Bei einigen weiblichen Nematoden waren Uterus und Ovar zerrissen. In der Keimzone waren die Oozyten und Oogonien als solches nicht mehr zu erkennen (Abb. 14).

Dosis 6 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Die bei der Nekropsie gefundenen 4 männlichen Nematoden wurden aufgrund ihrer stark milchigen Trübung und offenbaren Degeneration nicht mehr betrachtet.

4.8.2. Semi-Dünnschnitte

4.8.2.1. Kutikula, Hypodermis Muskulatur und Nervensystem

Kontrolle

Die im Querschnitt drehrunden Nematoden besaßen eine kräftige Kutikula. Die darunter liegende Hypodermis war bei allen betrachteten Exemplaren schwach ausgebildet. Die Muskelzellen waren vom Polymyaria-Typ und bestanden aus einem kontraktilem Teil mit zahlreichen Myosinfilamenten und einem nichtkontraktilem Teil (Abb. 15), der Strukturen wie Zellkern und Mitochondrien besaß und dessen Ausläufer als Axone zu den dorsalen und ventralen Nervenleisten zogen (Abb. 16).

0,2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Die untersuchten Nematodenquerschnitte waren nicht mehr von drehrunder Gestalt. Die Kutikula erschien teilweise dachziegelartig. In der Hypodermis sowie in den dorsalen und ventralen Nervensträngen ließen sich kleine Vakuolen erkennen. In einigen Tieren hatte sich zwischen der Hypodermisleiste und den kontraktilem Teilen der Muskelzellen ein Spalt gebildet (Abb. 17).

0,4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Die normalerweise drehrunden Nematoden waren stark deformiert. Die Kutikula erschien bei allen untersuchten Exemplaren dachziegelartig. Die darunter liegende Hypodermis war an vielen Stellen vakuolisiert. Bei einigen Nematoden hatten sich Freiräume zwischen den sonst lückenlos nebeneinander liegenden Muskelzellen gebildet. Die nichtkontraktilem Bereiche der Muskulatur waren meist aufgelöst oder vakuolisiert. Auffällig war bei allen untersuchten

Exemplaren eine Vergrößerung und Vakuolisierung des dorsalen und ventralen Nervenstrangs (Abb. 18).

4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Die Nematoden waren meist völlig deformiert. Die Kutikula erschien stark dachziegelartig. Die Hypodermis hatte sich in fast allen untersuchten Exemplaren teilweise von Kutikula und Muskulatur getrennt und erschien stark vakuolisiert. Sowohl der kontraktile als auch der nichtkontraktile Bereich der Muskulatur war an vielen Stellen massiv geschädigt. Zwischen den einzelnen Muskelzellen und den Hypodermissträngen haben sich deutlich sichtbare Hohlräume gebildet. Die Nervenstränge erschienen stark vergrößert und waren bei vielen Exemplaren völlig vakuolisiert (Abb. 20, 21, 22, 23).

4.8.2.2. Darm

Kontrolle

Der Darm besaß zum Lumen hin stets einen Mikrovillisaum, zum Pseudocoel hin wurde er durch eine dicke Basallamina abgegrenzt (Abb. 24).

0,2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung ließ sich kein Unterschied zu den Kontrollwürmern feststellen (Abb. 25).

0,4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Das Darmepithel erschien stärker vakuolisiert als bei den Kontrollwürmern.

2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Das Darmepithel erschien stärker vakuolisiert als bei den Kontrollwürmern (Abb. 26).

4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Das Darmepithel erschien stärker vakuolisiert als bei den Kontrollwürmern (Abb. 27).

4.8.2.3. Weibliches Geschlechtssystem

Kontrolle

Der Uterus war mit ovalen Eiern gefüllt. Im Ovar lagen die Oozyten dicht nebeneinander und wurden zum Pseudocoel durch eine dünne Basallamina abgegrenzt (Abb. 29).

0,2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Der Uterus zeigte in seiner Struktur keinen Unterschied zur Kontrolle. Im Ovar lagen die äußeren Oozyten nicht mehr im engen Kontakt. Es hatten sich kleine Freiräume zwischen ihnen gebildet (Abb. 31).

0,4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Bei einigen untersuchten Nematoden waren die Eier deformiert. Die Vitellinschicht und die darunter liegenden Schichten hatten sich an einigen Stellen gefaltet und vom Ei abgelöst (Abb. 30). Die Außenwand des Uterus war bei einigen Exemplaren leicht ausgefranst und erschien uneben. Bei allen untersuchten Exemplaren hatte sich die Basallamina des Ovars von den Oozyten gelöst und erschien gefaltet. Der dichte Verband der Oozyten hatte sich gelockert, und es hatten sich große Freiräume gebildet (Abb. 32, 33).

4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Auch hier erschienen bei den meisten Weibchen die Eier deformiert. Die Außenwand des Uterus war bei allen untersuchten Exemplaren stark ausgefranst, die Basallamina hatte sich an einigen Stellen vom Uterus abgelöst. Bei einigen Weibchen war die Basallamina des Ovars vollständig aufgelöst, so dass die Oozyten frei im Pseudocoel lagen. Bei nahezu allen untersuchten Nematoden hatte sich die Basallamina an einigen Stellen in ihre Einzelmembranen aufgetrennt (Abb. 34).

4.8.2.4. Männliches Geschlechtssystem

Kontrolle

Der Hodenschlauch war meist mehrmals im Querschnitt angeschnitten und zeigte unterschiedliche Reifestadien der Spermien (Abb. 35). Dabei erfolgte die Reifung von der Hodenschlauchwand zur Mitte hin (Hüttemann 2004). Die Samenblase war von einer starken Ringmuskulatur umgeben und enthielt die reifen Spermien.

0,2 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung ließ sich kein Unterschied zu den Kontrollwürmern feststellen.

0,4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Zwischen den Spermatozyten im Hodenschlauch ließen sich kleine Vakuolen erkennen (Abb. 36).

4 g CHLO 1/kg KGW Gerbil

Alle untersuchten männlichen Nematoden zeigten Vakuolisierungen im Bereich der Spermien (Abb. 37). Bei einigen Exemplaren war der Hodenschlauch so stark geschädigt, dass sich keine Zellstrukturen mehr erkennen ließen (Abb. 38). Es zeigten sich ebenfalls Vakuolen in der Ringmuskulatur des Hodenschlauchs und die abschließende Basallamina schien sich abzutrennen.

4.8.3. Ultradünnschnitte

Kontrolle

Alle Nematoden zeigten im Querschnitt eine mehrschichtige Kutikula. Die darunter liegende ca. 2 µm dicke Hypodermis enthielt Strukturen wie Zellkerne, freie Ribosomen und Mitochondrien. Die Muskelzellen bestanden aus einem kontraktilem Bereich mit deutlich sichtbaren Myosinfilamenten und Z-Zonen, der nichtkontraktile Teil enthielt den Zellkern, zahlreiche Mitochondrien (Abb. 51, 52) und Glykogenablagerungen, die im Elektronenmikroskop als dunkle Granula (Abb. 50) erschienen. Jede Muskelzelle war von einer Basallamina umschlossen und lag dicht an dicht mit der benachbarten Muskelzelle. Die Muskelzellausläufer zogen zu den dorsalen und ventralen Nervensträngen. Alle Axone waren ebenfalls von einer Basallamina umschlossen (Abb. 57). Bei den weiblichen Nematoden zeigten sich auf den Oberflächen der Oozyten kurze Mikrovilli (Abb. 71). Sie lagen dicht an dicht und wurden zum Pseudocoel hin durch eine Basallamina abgegrenzt. Bei den männlichen Nematoden war ebenfalls der Hodenschlauch von einer Basallamina umgeben. Die Spermatogonien lagen an der Wand des Schlauches und reiften zur Mitte hin über Spermatozyten I und II zu reifen Spermien (Abb. 61). Die Samenblase war umgeben von einer Ringmuskulatur, die von außen durch eine aufliegende Basallamina abgegrenzt wurde. Das Darmepithel beider Geschlechter enthielt neben einzelnen Vakuolen, freien Ribosomen, Mitochondrien und Zellkernen zum Lumen hin einen dichten Mikrovillisaum. Nach außen wurde der Darm durch eine Basallamina vom Pseudocoel abgegrenzt (Abb. 66).

Behandelte Nematoden

Wie schon die Semidünnschnitte zeigten, ließ sich mit steigender Dosierung der CHLO_1 eine vermehrte Vakuolisierung der Hypodermis erkennen. Bei einer Behandlungsstufe von

0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil waren solche Strukturschäden nur vereinzelt in einigen Bereichen der Hypodermis festzustellen. Bei den höheren Dosierungen von 2-4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil zeigten sich vermehrt Vakuolisierungen der Hypodermis (Abb. 53, 55). Bei Betrachtung der Kutikula ließen sich keine Strukturveränderungen erkennen. Bei einer Dosierung von 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil konnten keine Schäden in den kontraktilen Bereichen der Muskulatur festgestellt werden. Jedoch zeigte sich bei einigen Exemplaren im Bereich des Zellkontaktes an einigen Stellen eine Auflösung der Basallamina. Dieser Effekt wurde bei steigender Dosierung deutlich sichtbar. Zwischen den kontraktilen Teilen erschien die Basallamina aufgelöst, wodurch sich zwischen den benachbarten Muskelzellen und zur Hypodermis hin große Zwischenräume gebildet haben. Bei der näheren Betrachtung der nichtkontraktilen Muskelbereiche zeigten diese schon bei einer Konzentration von 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil eine Schädigung. Der gesamte Zellinhalt erschien stark lysiert, viele Mitochondrien erschienen geschwollen und abgerundet (Abb. 56). Auch hier zeigten sich bei zunehmender Konzentration Schäden in der umgebenden Basallamina. Die Basallamina der zu den dorsalen und ventralen Nervensträngen ziehenden Muskelzellausläufer hatte sich teilweise komplett von diesen abgelöst und es hat sich ein Spalt gebildet (Abb. 58, 59, 60). Die elektronenmikroskopische Betrachtung der Nervenstränge zeigte auch bei den niedrigen Konzentrationen von 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil einen gut sichtbaren Spalt zwischen der Hypodermisleiste und den benachbarten Muskelzellen (Abb. 59). Bei einer Konzentration von 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil wirkten die Axone in den dorsalen und ventralen Nervensträngen im Vergleich zu den Kontrollwürmern stark vergrößert und vakuolisiert (Abb. 58). Die Anzahl der Mikrotubuli in den Axonen erschien verringert. Auch die Basallamina des Ovars bei den weiblichen Nematoden zeigte eine Schädigung. In Abbildung 75 ist deutlich die Trennung der Lamina in ihre Einzelmembranen zu erkennen. Die Oozyten zeigten deutliche Oberflächenveränderungen. Die aufliegenden Mikrovilli waren abgetrennt und ungeordnet (Abb. 74). Die einzelnen Eizellen lagen nicht mehr im Zellverband. Bei einer Konzentration von 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil erschienen die Eier im Uterus deformiert. Deutlich sichtbar hatte sich die aufliegende Vitellinschicht an einigen Stellen vom Ei gelöst und erschien in diesen Bereichen gefaltet (Abb. 73). Viele Mitochondrien im Uterusepithel waren abgerundet und aufgelöst. Strukturschäden in den Geschlechtsprodukten der Männchen ließen sich bei Konzentrationen von 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil feststellen. In allen Reifestadien der Spermien erschienen die Mitochondrien stark vakuolisiert (Abb. 64). Auch die dem Hodenschlauch aufliegende Basallamina war stark geschädigt (Abb. 63). Dadurch wirkte die Oberfläche in einigen Bereichen unebenen und gefaltet. Der Darm beider Geschlechter zeigte erst bei einer Dosierung von 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil eine sichtbare Vakuolisierung des Darmepithels (Abb. 69). Auch hier erschienen die Mitochondrien

abgerundet und vakuolisiert. Bei einer Konzentration von 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil ließen sich keine Zellstrukturen mehr erkennen (Abb. 70). Die abschließende Basallamina blieb jedoch stets unversehrt.

4.9. Morphologische Untersuchungen an *Hymenolepis microstoma*

4.9.1. Semi-Dünnschnitte

Kontrolle

Der Querschnitt durch einen unbehandelten Cestoden *Hymenolepis microstoma* zeigte deutlich die den Wurm durchziehenden Exkretionskanäle und das ihm aufgelagerte Tegument (Abb. 41).

Behandelte Cestoden

Im Vergleich zu den im Querschnitt drehrunden Kontrollwürmern erschien das Tegument der behandelten Tiere stark dachziegelartig gefaltet (Abb. 42). Im Bereich des Scolex war das Tegument vollständig zerstört und lag teilweise nur noch als dünner Film der Oberfläche auf. Die darunterliegenden Muskel- und Parenchymzellschichten zeigten starke Vakuolisierungen (Abb. 44a). Im Bereich der Saugnäpfe war eine Vakuolisierung der Zellen am stärksten sichtbar (Abb. 44b).

4.9.2. Ultradünnschnitte

Kontrolle

Bei der Betrachtung der Ultradünnschnitte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie zeigte sich das die Oberfläche umgebende Tegument mit den aufliegenden Mikrotrichen. Die syncytiale Schicht enthielt zahlreiche Mitochondrien und erschien stark elektronendicht durch viele polysaccharidhaltige Organellen (Abb. 77, 78) (Mehlhorn und Piekarski, 1998).

Behandelte Cestoden

Eine völlige Zerstörung des Teguments zeigte sich vor allem in den Bereichen des Scolex und der Sprossungszone. In diesen Bereichen erschien das Tegument stark vakuolisiert, und die Mikrotrichen waren vollständig verschwunden (Abb. 79). Die im Syncytium liegenden Mitochondrien erschienen geschwollen und abgerundet. Die ansonsten homogene Basallamina war stark vakuolisiert. Zwischen Muskel- und Parenchymzellen hatten sich deutlich Spalträume gebildet (Abb. 80). Bei der Betrachtung der hinteren Segmente zeigte sich das Tegument weniger stark beschädigt. In einigen Bereichen erschienen die Mitochondrien abgerundet und vakuolisiert. Eine Schädigung der Basallamina sowie eine Bildung von Hohlräumen konnte ebenfalls beobachtet werden

5. Diskussion

5.1. Identifizierung des aktiven Wirkstoffs aus der Kokosnuss

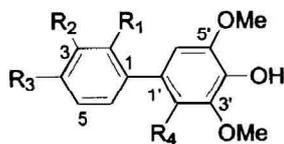
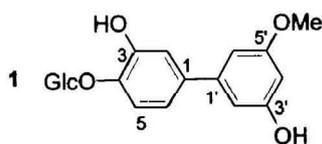
Dass die Kokosnuss eine Aktivität auf Nematoden der Art *Trichostrongylus colubriformis* (Straßen 2002), sowie auf den ebenfalls im Duodenum parasitierenden Cestoden *Vampirolepis* (syn. *Hymenolepis*) *nana* (Amorim und Borba 1995) besitzt, war im Vorfeld dieser Arbeit schon bekannt. Es erschien daher wichtig und sinnvoll die aktive(n) Komponente(n) zu isolieren und zu analysieren. Dabei konnte eine effektive Trennung der Extraktkomponenten mit Hilfe der Flüssig-Flüssig-Verteilung, gefolgt von einer Mitteldrucksäulenchromatographie an RP-18-Kieselgel-Material und anschließender Feintrennung auf Dünnschichtchromatographieplatten, erreicht werden. Bei der abschließenden präparativen Dünnschichtchromatographie reicherte sich die aktive Komponente in einer Bande an, die dann abgeschabt, reeluiert und entweder zur Überprüfung der Aktivität in einem eigens dafür entwickelten Bioassay verwendet oder für die anschließende Strukturanalyse herangezogen wurde. Die in dieser Arbeit entwickelte Screening-Methode hat sich gut bewährt, obwohl riesige Mengen an Probenmaterial (600 g) für die Isolation von nur einer sehr geringen Ausbeute der Wirkkomponente (0,5 mg) verwendet wurden. Auch die Reinigung über insgesamt fünf Trennungsschritte erwies sich als enorm zeitaufwändig und führte mit jedem Isolationsschritt zu einem großen Substanzverlust. Jedoch standen in dieser Arbeit keine anderen technischen Geräte und Mittel als die im Material- und Methodenteil aufgeführten zur Verfügung. Durch die Entwicklung eines geeigneten Bioassaysystems konnten in ersten Vorversuchen Rückschlüsse über die Natur und die Stabilität des aktiven Wirkstoffs gezogen werden. Als Testorganismen wurden Redien der Trematodenart *E. caproni*, L1-Larven der Nematodenart *A. cantonensis* sowie Adultnematoden von *T. muris* verwendet. Dabei zeigten nur die Adultnematoden präzise und vor allem dosisabhängige Resultate bei der Überprüfung der einzelnen Extrakte und Fraktionen. Die am Institut für Anorganische Chemie der Universität Düsseldorf mit Hilfe der Gas-Chromatographie untersuchte, in in-vitro-Assays als aktiv bestimmte Probe X4 zeigte in ihrem Massenspektrum 4 Hauptpeaks. Dabei ließen sich mit Hilfe der *Mainlib*-Datenbank die beiden bereits als Bestandteile der Kokosnuss bekannten Fettsäureglyceride Decanoin und α -Monolaurin identifizieren (Felter und Lloyd 1898). Als weitere Substanz konnte das bisher als Bestandteil der Kokosnuss unbekanntes *o*-Hydroxybiphenyl detektiert werden. Eine zu dem Peak $R_t = 7,99$ min zugehörige Substanz konnte nicht ermittelt werden. Die Überprüfung einer anthelminthischen Aktivität von α -Monolaurin, dem Glycerinderivat der Fettsäure Laurinsäure, führte weder in den in-vitro-, noch in den entsprechenden Tierexperimenten zu einem positiven Ergebnis. Da es sich bei

5. Diskussion

der aktiven Komponente der Kokosnuss scheinbar nicht um Fettsäureglyceride handelt, wurde von einer Überprüfung von Decanoin abgesehen. Bei der Überprüfung von o-Hydroxybiphenyl zeigte sich hingegen ein starker anthelminthischer Effekt auf die in-vitro behandelten Nematoden. Bei einer Konzentration von 1 mg/ml waren alle behandelten Würmer bereits nach 3 h tot. Auch im Tierversuch mit einer Dosis von 160 mg/kg KGW Gerbil zeigte o-Hydroxybiphenyl eine knapp 100%ige Reduktion der *T. muris* Nematoden. O-Hydroxybiphenyl (auch unter der Bezeichnung 2-Phenylphenol bekannt) wird eine antimikrobielle und fungizide Wirkung nachgesagt und findet Verwendung als Desinfektionsmittel (BPI, 1999) sowie als Konservierungsmittel von Zitrusfrüchten (Beemaert 1973). Eine anthelminthische Wirkung ist nicht bekannt. Bisher stehen nur die polychlorierten Derivate des Biphenyls (sogenannte PCBs) in Verdacht eine carcinogene Wirkung auf Menschen zu haben (NTP 2004). Über eine carcinogene Wirkung von 2- bzw. 4-Hydroxybiphenyl gibt es keine beweiskräftigen Studien.

Bei der als 4'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl identifizierten Substanz handelt es sich um ein 4-Hydroxybiphenyl, das mit Glukose gekoppelt ist. Dieses β -D-Glucopyranosid wurde bereits als Metabolit in *Talaromyces helicus* (Romero et al. 2005) identifiziert. Bisher wurde diese Substanz nicht in Pflanzen entdeckt. Es gibt jedoch Hinweise, dass ähnliche Biphenylglycoside durchaus in verschiedenen Pflanzen vorkommen und viele gerade erst entdeckt werden. So wurden in einer Studie von Dai et al. (2006) fünf neue Biphenylglycoside (siehe Abbildung) aus der Frucht des Chinesischen Feuerdorns

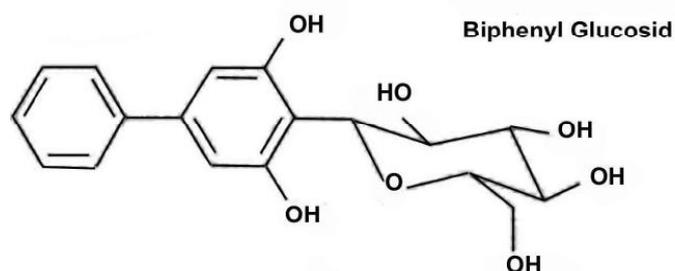
Pyracantha fortuneana



- 2: R₁ = OMe, R₂ = R₃ = H, R₄ = O-Glc
- 3: R₁ = O-Glc, R₂ = R₃ = R₄ = H
- 4: R₁ = OH, R₂ = O-Glc, R₃ = R₄ = H
- 5: R₁ = R₄ = H, R₂ = OH, R₃ = O-Glc

(*Pyracantha fortuneana*) isoliert. Auch in Studien von Zou et al. (2006) und Jiang et al. (2006) wurden ähnliche Biphenylglycoside aus *Calophyllum membranaceum* (Fam. Clusiaceae) (siehe Abbildung), bzw. aus den Blättern der Wollmispel (*Eriobotrya japonica*) isoliert. Bis auf eine nachgewiesene fungizide Wirkung gibt es keine Hinweise, ob die genannten Pflanzen und ihre Biphenylglycoside eine anthelminthische Aktivität besitzen.

Calophyllum membranaceum



5.2. Einsatzmöglichkeiten der Kokosnuss bei parasitischen Erkrankungen

Wirksame Naturstoffe bieten vielerlei neue Anwendungsmöglichkeiten. So können durch ihren Einsatz die durch die meisten Anthelminthika vorgeschriebenen Wartezeiten von mehreren Tagen bei Milchkühen und Masttieren vermieden werden, wodurch sich wirtschaftliche Einbußen drastisch minimieren ließen (Blood und Radostits 1995). Auch Ökobauern, die vor allem in Europa großen Zuspruch finden, hätten eine Möglichkeit, ihr Vieh natürlich vor Parasiten zu schützen, ohne gesetzliche Vorschriften durch die Verabreichung chemisch-synthetischer Mittel zu verletzen (EG-Verordnung 2005). Problemparasiten in den meisten Masttierbeständen ist der Spulwurm bei Schweinen (Stewart und Hale 1988, Kano und Makiya 2001), des weiteren spielen auch Trichostrongyliden-Infektionen bei Wiederkäuern (Fritsche et al. 1993, Zajak 2006) eine große Rolle. Vor allem bei der Behandlung von Trichostrongyliden-Infektionen haben sich gegen Benzimidazole, Levamisole und Avermectine Resistenzen gebildet (Beveridge et al. 1990, Besier et al. 1993, Gill und Lacey 1998, Macchi et al. 1999). Daher ist die Suche nach neuen, wirksamen Medikamenten sehr wichtig. Vielen Naturstoffen, wie z.B. Knoblauch (Grundzinski et al. 2001, Bany et al. 2003), wird eine Wirkung gegen Helminthen zugeschrieben, aber nur sehr wenige zeigen tatsächlich eine ausreichende Aktivität.

Der in dieser Arbeit gewählte Testparasit *Trichuris muris* eignet sich in sofern besonders gut zur Wirksamkeitsüberprüfung von Medikamenten, da dieser Parasit einige Besonderheiten mit sich bringt. Peitschenwürmer, auch die des Menschen (*T. trichiura*) gelten als sehr hartnäckige Parasiten und sind mit vielen handelsüblichen Anthelminthika wie beispielsweise Pyrantel oder Albendazol nur schwer zu entfernen (McFarland und Howes 1972, Löscher et al. 1999) (siehe Tabelle).

Wirkungsspektrum verschiedener Anthelminthika (Ungemach, 1999)									
	Thia- bendazol	Me- bendazol	Al- Bendazol	Fen- bendazol	Feb- antel	Pyr- antel	Mor- antel	Aver- mectin	Piper- azin
Trichuris (Rind, Schaf)	-	xx	-	(x)	(x)	-	-	(-)	0
Haemonchus (Rind, Schaf)	xx	xx	xx	xx	xx	(xx)	xx	xx	0
Ostertagia (Rind, Schaf)	(x)	(xx)	xx	xx	xx	(xx)	(xx)	xx	(x)
Trichostrongylus (Rind, Schaf)	xx	xx	xx	xx	xx	(x)	(xx)	xx	0
Wirksamkeit: xx: >90% x: >80% -: <80% 0: unzureichend oder nicht vorhanden									
Angaben in Klammern: Wirkung nur gegen adulte Formen									

Zusätzlich sind sie mit dem gesamten Vorderteil tief im Epithel der Mukosa verankert (Lee und Wright 1978; Harder in Mehlhorn 2001, Tilney et al. 2005) (Abb. 5) und nehmen ihre Nahrung nicht durch den Mund sondern durch die Kutikula auf (Lee und Wright 1978). Auch

die Juvenilstadien des Peitschenwurms bieten eine Besonderheit. Sie dringen während ihrer Larvalentwicklung in die Epithelzellen der Mukosa des Darms ein (Panesar 1981) und sind dann für extrazellulär bzw. extraintestinal wirkende Anthelminthika nur schwer erreichbar. Die in dieser Arbeit durchgeführten Behandlungsversuche (Kap. 4.5.5.) haben deutlich gezeigt, dass mit einer ausreichenden Menge Kokosnussfleisch (6 g CHLO_1/kg KGW Gerbil) eine völlige Reduktion der *Trichuris muris*-Nematoden erreicht wird, ohne äußerlich sichtbare Nebenwirkungen bei den Versuchstieren zu erzeugen. Eine solche Reduktionsrate ist für einen reinen Naturstoff bemerkenswert. Auch mit einer 10-fach niedrigeren Dosis von 0,2 g CHLO_1, bzw. 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil konnten immerhin noch 67,5 % bzw. 76 % der Nematoden aus dem Wirtsgewebe eliminiert werden. Vergleichbare Reduktionsraten konnten bei mit *T. muris* infizierten Mäusen nach einer einmaligen Behandlung von 0,2 ml Profender®/kg KGW Maus erzielt werden. Auch hier führte die Behandlung zu einer vollständigen Eliminierung der Parasiten aus dem Wirtsgewebe (Fese 2005). In einer Studie von Rajasekariah et al. (1991) konnten mit einer Dosis von 12,5 mg Oxantel/kg KGW Maus 100% der *T. muris* Nematoden aus dem Wirtstier vertrieben werden. Im Vergleich dazu zeigte eine Dosis von 150 mg Albendazol/kg KGW Maus eine Reduktion der Nematoden von nur 53%. Die Applikation von 12,5 mg Mebendazol/kg KGW Maus erreichte eine Reduktion der Nematoden von 70%. Die 3-malige Behandlung mit 0,4 ml des flüssigen Endosperms der Kokosnuss konnte in einer vorangegangenen Studie nahezu 80% der *Trichostrongylus colubriformis* Nematoden aus dem Wirtsgewebe eliminieren (Straßen 2002). Der Vergleich der einzelnen Studien verdeutlicht die gute anthelminthische Wirksamkeit der Kokosnuss, wobei nicht zu verachten ist, dass hier niemals der reine, isolierte Wirkstoff verabreicht wurde.

Gute Medikamente sollten gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Parasitenspezies helfen. So gibt es nur wenige Medikamente, wie beispielsweise Benzimidazole, die gegen Cestoden und Nematoden gleichzeitig wirken (Hutchison et al. 1975). Um eine Einsatzmöglichkeit der Kokosnuss auf verschiedene Parasitenspezies zu überprüfen, wurden unter anderem Bandwürmer (*H. microstoma*, *H. diminuta*, *T. taeniaeformis*), Trematoden (*F. hepatica*, *E. caproni*), weitere Nematodenarten (*T. cati*, *A. cantonensis*) und einige Vertreter der Protozoen (*T. muris*, *E. papillata*) als zusätzliche Testorganismen gewählt. Dabei zeigten sich bei den im Kapitel 4.7. durchgeführten in-vitro-Experimenten Aktivitäten, sowohl bei den Cestoden der Art *H. microstoma*, wie auch bei den Trematoden der Arten *E. caproni* und *F. hepatica*. Bei den in Kapitel 4.8. durchgeführten in-vivo-Experimenten konnten lediglich Cestoden der Art *H. diminuta* und *T. taeniaeformis* und Nematoden der Art *T. cati* erfolgreich beseitigt werden. Es handelt sich hierbei ausschließlich um intestinal parasitierende Parasitenspezies. *F. hepatica*, *E. caproni* und die Cestodenart

H. microstoma, die in den in-vitro-Versuchen mit dem Kokosextrakt geschädigt wurden, konnten in-vivo nicht abgetötet werden. Dabei spielen eine Vielzahl von Faktoren bei der Aktivität eines Wirkstoffs auf einen Parasiten eine Rolle. Wo und in welchem Gewebe ist der Parasit lokalisiert? Wie wird der Wirkstoff vom Wirtstier absorbiert? Auf welchem Weg gelangt der Wirkstoff in den Parasiten? Wie und vor allem wie schnell wird der Wirkstoff aus dem Wirtstier eliminiert? Aufgrund der Behandlung von verschiedenen Parasitenstämmen und -klassen, die zudem noch in den unterschiedlichsten Wirtsgeweben vorkommen und durch den Vergleich der Ergebnisse aus den in-vitro-Versuchen, können Rückschlüsse auf eine eventuelle Wirkweise gezogen werden. Wie bereits erwähnt, konnten in dieser Arbeit lediglich Darmnematoden, wie z.B. *Trichuris muris* und *Toxocara cati*, eliminiert werden sowie die ebenfalls im Darm parasitierenden Cestodenarten *Hymenolepis diminuta* und *Taenia taeniaeformis*. In bereits vorangegangenen Studien (Straßen 2002) konnte ebenfalls ein Behandlungserfolg beim Darmnematoden *Trichostrongylus colubriformis* festgestellt werden. Zwar zeigte sich in den in-vitro-Versuchen bereits nach wenigen Minuten eine Wirkung auf Cestoden der Art *H. microstoma*, in den Tierexperimenten konnten diese jedoch auch mit einer mehrmaligen Applikation des Extraktes nicht reduziert werden. Bei der Behandlung der verwandten Cestodenart *H. diminuta* reichte bereits eine einmalige Verabreichung des Extraktes CHLO_1 aus, um alle Parasiten aus dem Wirtstier zu vertreiben. Studien von McCracken et al. (1992) wiesen darauf hin, dass mit einer dreimaligen Verabreichung von Albendazol eine Reduktion der *H. microstoma* Cestoden von 50% erreicht werden konnte, hingegen eine vergleichbar niedrige einmalige Dosis auch hier ausreichte, um alle *H. diminuta* Cestoden abzutöten. McCracken et al. (1992) gehen davon aus, dass *H. microstoma* resistenter gegen Anthelminthika ist als *H. diminuta*. Ein Vergleich aller in dieser Arbeit durchgeführten in-vitro-Versuche mit den entsprechenden Tierexperimenten spricht jedoch für eine andere Hypothese. Entweder wird der Wirkstoff vom Wirtstierorganismus intrazellulär nicht aufgenommen, oder die Menge, die letztendlich das Zielgewebe des Parasiten erreicht, ist nicht ausreichend um diesen zu eliminieren. Im Fall von *H. microstoma* wurden die in den Gallengängen der Wirtstiere befindlichen Scolices und Proliferationszonen der Cestoden von dem Wirkstoff nicht geschädigt. Lediglich die in den Darm ragende Strobila wurde zerstört. Im Fall von *F. hepatica* und *E. caproni* zeigten die Tierexperimente ebenfalls keinen Erfolg. Auch die Behandlung der intrazellulär in den Epithelzellen der Mukosa liegenden Juvenilstadien von *T. muris* führte zu keinem positiven Ergebnis. Nach einer Behandlung mit einer für die adulten Nematoden lethalen Wirkstoffmenge von 6,0 g CHLO_1/kg KGW Gerbil konnte bei den durchgeführten Kotuntersuchungen an den Tagen 45, 47 und 48 p.i. eine mit den Kontrolltieren vergleichbare Anzahl von Eiern nachgewiesen werden. Eine Behandlung von mit *A. cantonensis* infizierten Ratten mit dem Extrakt führte nicht zu einer Eliminierung der in den Lungenpulmonalarterien parasitierenden

Adultnematoden. Jedoch wurde zum Zeitpunkt der Behandlung ein Großteil aller Larven L1, die mit dem Kot ausgeschieden wurden abgetötet. Mit Beendigung der Therapie wurden wieder lebende Larven mit den Fäzes abgesetzt. Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass das als aktiv bestimmte Biphenylglycosid 4'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl entweder vom Wirtstierorganismus nicht absorbiert, also nicht intrazellulär aufgenommen wird, zu einer inaktiven Form abgebaut oder zu schnell ausgeschieden wird. In einer Studie von Bartels et al. (1998) wurde die Absorption von ortho-Hydroxybiphenyl bei Mäusen, Ratten und beim Menschen getestet. Innerhalb von 48 h nach der oralen Gabe von 15-800 mg o-Hydroxybiphenyl/kg KGW wurde ca. 90% mit dem Urin wieder ausgeschieden. Innerhalb von 8 h erfolgte die Ausscheidung von o-Hydroxybiphenyl über den Urin nach einer dermalen Applikation beim Menschen. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass o-Hydroxybiphenyl durchaus vom Organismus intrazellulär aufgenommen wird und die Aufnahme sogar über die Haut erfolgen kann. Zum anderen könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Hydroxybiphenyl vom Organismus auch relativ schnell wieder ausgeschieden wird und somit die Wirkstoffmenge, die das Zielgewebe erreicht, nicht ausreicht um den Parasiten abzutöten bzw. zu vertreiben. Eine Studie von Douch und Blair (1975) zeigte anhand von *A. lumbricoides* und dem Cestoden *Moniezia expansa*, dass diese unfähig waren, Biphenyle zu oxidieren und somit abzubauen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, warum Biphenyle diese Parasiten schädigen, Säugetiere jedoch in der Lage sind, solche Substanzen zu verstoffwechseln.

Obwohl *E. caproni* als Adultwurm im Ileum bzw. im Jujenum des Dünndarms parasitiert (Nollen 1996, Hosier und Fried 1991), scheint die Menge, die den Parasiten erreicht, nicht auszureichen um diesen sehr widerstandsfähigen Trematoden abzutöten. Behandlungsexperimente mit den Protozoen *Trichomonas muris* und *Eimeria papillata* zeigten in beiden Fällen keine Erfolge.

5.3. Morphologische Befunde

Die in dieser Arbeit durchgeführten raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Trichuris muris* Nematoden sollten eventuelle morphologische Schäden, die aufgrund einer Behandlung mit Kokosnuss entstanden sein könnten, zeigen. Dazu wurden bei beiden Untersuchungsmethoden männliche und weibliche Adultnematoden aus behandelten und unbehandelten Gerbils verwendet und nach der in Kapitel 3.5. beschriebenen Methoden präpariert. Die rasterelektronenmikroskopischen Befunde zeigten bei beiden behandelten Geschlechtern eine deutliche Deformierung des gesamten Wurmkörpers. Die enger liegende Kutikularingelung, die stets ausgefahrenen Spicula bei

den männlichen Nematoden und die bereits erwähnte Deformierung deuten dabei auf eine Verkrampfung der behandelten Nematoden hin. Im Vergleich dazu waren die unbehandelten Nematoden stets von drehrunder Gestalt, das Spiculum der Männchen trat nicht zum Vorschein und auch die Ringelung der Kutikula lag weiter auseinander. Eine oberflächliche Schädigung der Kutikula selbst konnte jedoch bei den behandelten Tieren nicht festgestellt werden.

Bei der Betrachtung der inneren Organe mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie konnte vor allem bei den stark behandelten Nematoden eine deutliche Schädigung verschiedener Gewebe beobachtet werden. Es zeigte sich in allen untersuchten Exemplaren das gleiche Erscheinungsbild. Bei einer schwachen Dosierung von 0,2 g CHLO_1/kg KGW zeigten sich Vakuolisierungen in der Hypodermis. Vor allem die Mitochondrien erschienen abgerundet, geschwollen und zerstört. Auch die nichtkontraktilen Bereiche der Muskulatur waren teilweise aufgelöst und die Mitochondrien ebenfalls abgerundet und vakuolisiert. Bei steigender Dosierung konnten zusätzlich Schäden in den kontraktilen Bereichen der Muskulatur sowie eine Hohlraumbildung zwischen den Muskelzellen beobachtet werden. Diese Effekte wurden ebenfalls bei einer Behandlung von *Heterakis spumosa* mit Pyrantel und Febantel beobachtet (Mehlhorn und Harder 1997). Auch hier bildeten sich bei beiden Medikationen, die auch bei der Behandlung mit Kokosextrakt festgestellten Spalträume zwischen den einzelnen Muskelzellen. Eine Vergrößerung der Nervenstränge mit vakuolisierten Axonen konnte ebenfalls bei der Behandlung mit Febantel beobachtet werden. Auch hier waren in den Axonen wesentlich weniger Mikrotubuli als bei den unbehandelten Kontrolltieren. Die charakteristische Ablösung der Basallamina und eine Trennung in ihre Einzelschichten, der Lamina densa, Lamina rara und der meist noch zusätzlichen fibrillären Lamina fibroreticularis (z.B. bei den Oozyten), wurde bei der Behandlung von Nematoden mit Febantel oder Pyrantel (Mackenstedt et al. 1993, Mehlhorn und Harder 1997) nicht festgestellt. Bei der Behandlung von *Trichuris muris* mit Profender®, einem Kombinationspräparat aus Emodepsid und Praziquantel, konnte weder eine Vergrößerung der Nervenstränge mit einer Vakuolisierung der Axone, noch eine Ablösung der Basallamina von den umgebenden Geweben beobachtet werden (Frese 2005). Emodepsid, das gegen Rundwürmer aktiv ist, stimuliert die Rezeptoren an den neuromuskulären Synapsen und führt zu einer Lähmung und schließlich zum Tod des Parasiten (Harder und Samson-Himmelstjerna 2002). Auch bei der, in der selben Studie eingesetzten Therapie der *T. muris* Nematoden mit Advocate®, einem Kombinationspräparat aus Moxidectin, das als makrozyklisches Laktone die Freisetzung von GABA stimuliert (Reinemeyer und Charles 2003), und dem Insektizid Imidacloprid (BayerCropScience), wurden derartige Gewebeeränderungen nicht beobachtet. Die gut sichtbare Ablösung der Basallamina vom Oogonium wurde bei beiden Medikationen ebenfalls nicht festgestellt.

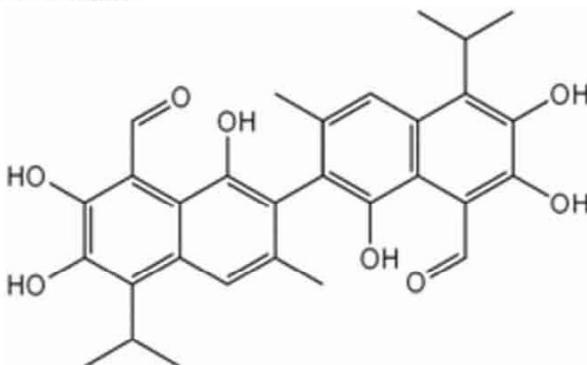
Bei einer höheren Dosierung zeigte sich als Schadbild vor allem eine teilweise Ablösung der Hypodermis von der darüber liegenden Kutikula. Die Hohlräume zwischen den Muskelzellen und dem ventralen und dorsalen Hypodermisstrang hatten sich vergrößert, so dass die Muskelzellen nicht mehr als dichter einheitlicher Gewebeverband erschienen. Die Bereiche der Nervenstränge waren meist vollständig zerstört. Auch bei der Betrachtung des weiblichen Geschlechtssystems zeigten sich deutliche Veränderungen in den Ovarien. Im Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren, in denen die Oozyten dicht gepackt aneinander lagen und laut Studien kleine Mikrovilli an den Oberflächen besitzen (MacKinnon et al. 1992, Hüttemann 2004), lagen vor allem die äußeren Oozyten (Oozyten II) der behandelten Tiere frei im Ovar. Die Außenmembran der Oozyten war stark deformiert und die Mikrovilli teilweise abgelöst, oder sie lagen ungeordnet an der Außenseite. Die das Oogonium umgebende Basallamina erschien, wie bereits erwähnt, stark geweitet und war an vielen Stellen in ihre Einzelmembranen aufgetrennt. Der Bereich der Rhachis zeigte keine sichtbaren Schäden. Bei der Betrachtung des Uterus zeigten sich Deformierungen der Eier. Die einzelnen Schichten der Eischalen lagen dabei weit auseinander und erschienen gewellt. Die dem Uterus aufliegende Basallamina zeigte das zuvor erwähnte Schadbild. Bei Dosierungen von 4 g/kg KGW konnten abgerundete und geschwollene Mitochondrien im Uterusepithel festgestellt werden. Bei der Betrachtung der Geschlechtssysteme der männlichen Nematoden konnte ebenfalls eine bereits erwähnte Ablösung der Basallamina beobachtet werden. Im Bereich der Hodenmuskulatur zeigten sich viele Vakuolen. Wie auch in einer Studie von Mackenstedt et al. (1993) konnten in den Spermatozyten und Spermatiden geschwollene und geschädigte Mitochondrien beobachtet werden. Zwischen den Spermien erschienen viele Vakuolisierungen und Freiräume. Erst bei hohen Dosierungen von 2 und 4 g CHLO_1/kg KGW zeigten sich Schäden in Form von Vakuolisierungen im Epithel des Darms sowie eine Schädigung der Mitochondrien. Die abschließende Basallamina blieb jedoch unversehrt.

Bei der Betrachtung des Gesamtschadbildes und beim Vergleich mit dem durch andere Anthelminthika verursachten Schadbildes zeigten sich sowohl Gemeinsamkeiten als auch signifikante, bisher unbeobachtete Phänomene, wie z.B. die Zerstörung und Ablösung der Basallamina und die massive Schädigung der Nervenstränge. Bisher ist meist relativ wenig über die Aufnahmeart von Anthelminthika bekannt. So soll Levamisol beispielsweise über die Kutikula aufgenommen werden (Verhoeven et al. 1976, Roy et al. 1981), während Mebendazol oral vom Parasiten aufgenommen wird (Van der Bossche und De Nollin 1973). Auch Pyrantel scheint oral vom Parasiten aufgenommen zu werden. Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung zeigten sich hier anfängliche Schäden erst im Bereich des Darmepithels. Die Behandlung mit Febantel zeigte hauptsächlich Schäden in

den peripheren Bereichen, wie Hypodermis, Muskelzellen und Nervenstränge (Mehlhorn und Harder 1997). Zieht man diese Erkenntnisse in Betracht, so könnte der Aufnahmeweg für das in dieser Arbeit als wirksame Komponenten analysierte Biphenylglycosid ebenfalls über die Kutikula erfolgen. Anfängliche Schäden zeigten sich vor allem im Bereich der Hypodermis, der Muskelzellen und der Nervenstränge. Hingegen fand eine Schädigung des Darms erst bei höheren Dosierungen statt. Diese Hypothese müsste jedoch erst durch autoradiographische Untersuchungen bestätigt werden. Bei der Betrachtung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen der in-vitro behandelten Cestoden der Art *H. microstoma* fällt sofort die erhebliche Schädigung des Teguments auf. Es gibt eine Reihe Anthelminthika, die das Tegument von Cestoden und Trematoden beeinflussen und zerstören (Becker et al. 1981). Die in dieser Arbeit durch die Behandlung mit Kokosnussextrakt beobachteten Veränderungen bzw. die völlige Zerstörung des Teguments zeigt Ähnlichkeiten mit beobachteten Schäden nach Einwirken anderer Anthelminthika, wie z.B. Niclosamid (Stoitsova et al. 1991). Auch hier zeigten sich Vakuolisierungen in der syncytialen Schicht, wie auch abgerundete und geschwollene Mitochondrien. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Auflösung der ansonsten homogenen Basallamina und die Spaltenbildung zwischen den einzelnen Muskel- bzw. Parenchymzellen. Ein solches Schadbild konnte ebenfalls bei der Behandlung von *Hymenolepis nana* mit Butamidine, ein Naphtamidine Derivat (Hart et al. 1977), wie auch bei der Behandlung von *Fasciola hepatica* mit Albendazol-Sulfoxid (Buchanan et al. 2002) beobachtet werden. Das ist ein weiteres Indiz, das für die Aufnahme durch die Parasitenoberfläche spricht. Eine völlige Ablösung des Teguments konnte nur bei der Behandlung von *Taenia taeniaeformis* Metacestoden mit Gossypol, einem natürlichen Biphenyl aus dem Samen der Baumwollpflanze (*Gossypium*) festgestellt werden (Rikihisa et al. 1990). Gossypol ist seit langen als Anti-Malariamittel (Razakantoanina et al. 2000), als Verhütungsmittel für den Mann (Coutinho 2002) und als

Gossypol

2,2'-bis-(Formyl-1,6,7-trihydroxy-5-isopropyl-3-methylnaphthalene)
CAS-No.: 303-45-7
C₃₀H₃₀O₈
518.563 g/mol



Inhibitor vieler Dehydrogenasen (Meksongsee et al. 1970) bekannt.

In weiteren Studien zeigte ein Einsatz von verschiedenen Polyphenolen, vor allem von 2-Hydroxybiphenyl einen schädigenden Einfluss auf Membranen und Mitochondrien (Maudinas et al. 1973, Hakimuddin et al. 2006). Diese Beobachtung könnte die bereits

erwähnten Schäden an den Basalmembranen und Mitochondrien sowohl bei *T. muris*, als auch bei dem Cestoden *H. microstoma* erklären. Auch die amphiphile Struktur des Gesamtkomplexes 4'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl könnte einen Einfluss auf die Membranstabilität besitzen. Viele amphiphile Substanzen interagieren mit biologischen Membranen, indem sie den hydrophoben Teil in die Lipidmembran einfügen. Durch die Veränderung der physikalischen Eigenschaften können diese zerstört werden (Bolard 1986, Hartsel et al. 1993, Yamashita et al. 1995).

5.4. Bewertung der Versuchsergebnisse

Obwohl viele Tierexperimente lediglich mit 2 oder 3 Versuchstieren durchgeführt wurden, zeigen die Ergebnisse eine signifikante Wirkung auf die Nematodenarten *T. muris* und *T. cati* als auch auf die Cestodenarten *H. diminuta* und *T. taeniaeformis*. Alle Versuchstiere wurden erst nach der Präpatenzzeit, also nach Beginn der Eiausscheidung, mit den verschiedenen Extrakten behandelt. Auch war durch Kontrolle der Fäzes sichergestellt, dass alle Versuchstiere mit einer 100%igen Wahrscheinlichkeit infiziert waren. Ein Versuchsansatz mit vielen Tieren wurde damit hinfällig. Auch die durchgeführten Kotuntersuchungen und Sektionen lieferten zuverlässige Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die zuvor infizierten Versuchstiere nach einer Behandlung mit den verschiedenen Kokosnussextrakten keine oder deutlich weniger Eier ausschieden und auch in der anschließend durchgeführten Sektion keine oder weniger Würmer aufwiesen. Ein Behandlungsmisserfolg konnte deutlich erkannt werden, da die Kotuntersuchungen bzw. die Ergebnisse der Sektion ein mit den Kontrolltieren vergleichbares Bild lieferten.

Bei den Dosis-Wirkungsexperimenten wurden ebenfalls relativ wenige Tiere behandelt, um eine signifikante Wirksamkeit bei der entsprechenden Dosierung zu bestätigen. Dabei zeigten die Ergebnisse deutlich, dass mit einer Dosis von 4 bis maximal 6 g CHLO_1/kg KGW Gerbil eine 100%ige Eliminierung der Nematoden erfolgt. Die in den mit einer Dosis von 6 g CHLO_1 behandelten Versuchstieren wiesen zwar nach 48 h noch 1 bis 2 Nematoden auf, diese waren jedoch bei lichtmikroskopischer Betrachtung nicht mehr lebensfähig. Die in-vivo-Behandlungsversuche mit o-Hydroxybiphenyl zeigten deutlich, dass mit der alleinigen Verabreichung dieser Substanzkomponente eine 100% Reduktion der Würmer erreicht wird. Sowohl bei der anfänglich durchgeführten massenspektroskopischen-, als auch bei der abschließenden NMR-spektroskopischen Untersuchung wurde Hydroxybiphenyl als Komponente entdeckt. Ob es sich bei dem isolierten Biphenylglycosid 4'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl tatsächlich um das wirksame Prinzip der Kokosnuss handelt, kann in dieser Arbeit aber nicht bestätigt werden. Lediglich in den in-vitro-Versuchen konnte

ein Effekt auf die Nematoden nachgewiesen werden. Die entsprechenden Tierversuche wurden aufgrund der bei der Extraktion erhaltenen geringen Substanzmenge nicht durchgeführt.

Interessant wäre eine Überprüfung, ob und in welchen Dosierungen 2-Hydroxybiphenyl als Reinsubstanz auch weitere, vor allem die in dieser Arbeit verwendeten Testparasiten eliminieren kann. Eventuell könnten mit entsprechend hohen Dosierungen auch Parasiten geschädigt werden, die außerhalb des Darms sitzen.

6. Zusammenfassung

***Cocos nucifera*: Untersuchungen zur Wirkung von Extrakten auf Parasiten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die anthelminthisch aktiven Komponenten der Kokosnuss (*Cocos nucifera*) zu isolieren und zu analysieren. In einem speziell entwickelten in-vitro-Testsystem wurden dazu verschiedene Extraktionstypen untersucht und auf ihre Aktivität hin getestet. Dabei stellte sich eine Extraktion mit dem Lösungsmittel Ethanol als geeignet heraus. In weiteren Versuchen wurde die aktive Komponente mit Hilfe einer Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Wall (1996) und einer weiteren Isolierung über eine Mitteldrucksäulenchromatographie an einer RP-18W Kieselgelsäule und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die jeweils erhaltenen Fraktionen und Proben wurden stets in einem in-vitro-Assay auf ihre Aktivität hin überprüft. Die gereinigte und als aktiv bestimmte Probe wurde abschließend gaschromatographisch und NMR-spektroskopisch analysiert.

In weiteren Versuchen wurde ein aufgereinigter Chloroformextrakt (CHLO_1) in verschiedenen Konzentrationen zur Therapie gegen den gastrointestinalen Nematoden *Trichuris muris* im Gerbil eingesetzt. Dabei zeigte sich schon bei einer einmaligen Dosis von 0,2 g/kg KGW Gerbil eine Reduktion der Wurmlast von 67,5% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Bei einer Dosis von 4 bzw. 6 g/kg KGW Gerbil konnte eine Reduktion der Nematoden von 91,5% bzw. 98,9% erreicht werden. Dabei erschienen alle angetroffenen Würmer unbeweglich und nur lose im Darm verankert.

Im Weiteren wurde die Wirkung des Kokosextraktes auf die Morphologie von *Trichuris muris* Nematoden mit Hilfe der Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Dabei zeigten sich bei einer Dosis von 0,2 g CHLO-1/kg KGW Gerbil vorwiegend Schäden im Bereich der nichtkontraktilen Elemente der Muskulatur und in der Hypodermis. Hervorzuheben sind besonders eine Lückenbildung zwischen den einzelnen Muskelzellen und der Hypodermis, wie auch eine Vakuolisierung im Bereich der lateralen und dorsalen Nervenstränge. Bei höheren Behandlungsstufen zeigten sich ebenfalls Schäden an den Mitochondrien der Spermien, am Uterusepithel und am Darmepithel. Zunehmend wurde eine Ablösung der Basallamina im Bereich des Ovars, des Uterus bei den Weibchen sowie der Testes bei den Männchen deutlich. Auch im Bereich der kontraktilen und nichtkontraktilen Teile der Muskelzellen sowie bei den Nervenzellen zeigte sich eine Trennung der Basallamina in verschiedene Schichten. Morphologische Untersuchungen am Cestoden *Hymenolepis microstoma* zeigten im Bereich des Scolex eine nahezu vollständige Ablösung des Teguments. Auch hier haben sich Lücken zwischen den Muskel- und Parenchymzellen gebildet. Hydroxybiphenyle beeinflussen Biomembranen und Mitochondrien.

6. Zusammenfassung

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Einsatzfähigkeit der Kokosnuss als Antiparasitikum in in-vitro-Experimenten und anschließend im Tierversuch mit experimentell infizierten Mäusen und Ratten, bzw. natürlich infizierten Katzen an unterschiedlichen Parasitenspezies der Klassen Cestoda, Nematoda, Trematoda und ebenfalls auf Protozoen der Ordnungen Coccidia und Trichomonadida getestet. Dabei zeigte sich bei den in-vitro-Versuchen mit *Hymenolepis microstoma*, *Fasciola hepatica* und *Echinostoma caproni* eine Wirkung. In den Tierversuchen konnte lediglich bei gastrointestinalen Helminthen, wie *Hymenolepis diminuta*, *Taenia taeniaeformis* und *Toxocara cati* eine Reduktion der Wurmlast erreicht werden. Kein Erfolg zeigte sich bei der in-vivo-Behandlung von *Hymenolepis microstoma*, *Fasciola hepatica*, *Echinostoma caproni*, *Angiostrongylus cantonensis* und bei der Therapie der intrazellulär parasitierenden Juvenilstadien von *T. muris*. Auch Eimerien und Trichomonaden konnten in den in-vivo-Versuchen nicht eliminiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Kokosnuss als biologisches Breitband-Anthelminthikum gegen einige gastrointestinale Helminthen eignet.

7. Summary

***Cocos nucifera*: Studies on the effects of extracts on parasites**

In the course of this study several tests were done to separate and analyze the anthelmintic active compound of coconut-extracts. A special designed in-vitro-assay was used to test the activity of several types of extracts. The extraction with ethanol as solvent was adequate. In further studies the active compound was separated by solvent-solvent-extraction (Wall, 1996) and medium-pressure-chromatography being finally purified by thin layer chromatography. The activity of the obtained fractions and samples was then tested in bioassays. The cleaned sample was finally analyzed by gaschromatographic and nmr-spectroscopic methods.

Several concentrations of the purified chloroform extract were utilized in therapy tests against the gastrointestinal nematode *Trichuris muris*. These tests showed that a single dose of 0.2 g/kg body weight (BW) jird led to a reduction in worm burden of 67.5% in contrast to the untreated control group. A dosage of 4 and respectively 6 g/kg BW led to a reduction of 91.5% and 98.9%. All worms recovered were immobile and no longer fixed at the intestinal mucosa.

Further experiments dealt with the effects of the coconut extracts on the morphology of *Trichuris muris* using scanning- and transmissionelectron microscopy. Thereby a dose of 0.2 g/kg BW led to damages predominantly in the cytoplasmatic portion of the muscles and in the hypodermis. Noteworthy are the gaps between muscle cells and the hypodermis, as well as a vacuolization of the lateral and ventral nerve cords. Damages of the mitochondria of sperms, of the epithelium of the uterus and of the gut occurred and additionally at higher dosages an increasing destruction of the basal lamina of the ovar, the uterus and the testes was observed. A destruction of the basal lamina was also observed in areas of the fibrillar and the cytoplasmatic portions of muscle cells as well along axons of the nerve cells. Morphological studies on the cestode *H. microstoma* showed a nearly complete debonding of the tegument. An accumulation of gaps between cells of the musculature and the parenchyma was also observed. Hydroxybiphenyls are known to affect membranes and mitochondria.

The ability to use extracts of the coconut as antiparasitic drug was tested by in-vitro- and in-vivo-experiments. In-vivo-studies were done with naturally and experimentally infected cats, mice or rats with cestodes, trematodes, nematodes and protozoans. There was a significant effect on *H. microstoma*, *F. hepatica* and *E. caproni* in-vitro. In in-vivo studies with gastrointestinal helminths like *H. diminuta*, *T. taeniaeformis* and *T. cati* a reduction of the

7. Summary

worm burden was seen. The treatment of host infected with *H. microstoma*, *F. hepatica*, *E. caproni*, *A. cantonensis* and the therapy of the juvenile stages of *T. muris* showed no positive results. The treatment of hosts infected with *Eimeria papillata* and *Trichomonas muris* led not to an elimination of these parasites either. The results showed an ability of the coconut for use as biological broadspectrum anthelmintic drug against some gastrointestinal helminths.

8. Literaturverzeichnis

- Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos GM** (2005) Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 100(1-2):153-7
- Allen RR** (1965) Volatile flavour constituents in coconut oil. *Chem Ind* 36: 1560
- Amorim A, Borba HR** (1995) Ação anti-helmíntica de plantas XI. Influência de extratos brutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae) na eliminação de *Vampirolepis nana* em camundongos. *Rev Bras Farm* 76(4):98-99
- Andreassen J, Ito A, Ito M, Nakao M, Nakaya K** (2004) *Hymenolepis microstoma*: direct life cycle in immunodeficient mice. *J Helminthol* 78: 1-5
- Bany J, Zdanowska D, Zdanowski R, Skopinska-Rozewska E** (2003) The effect of herbal remedy on the development of *Trichinella spiralis* infection in mice. *Pol J Vet Sci* 6(3): 6-8
- Bartels MJ, McNett DA, Timchalk C, Mendrala AL, Christenson WR, Sangha GK, Brzak KA, Shabrang SN** (1998) Comparative metabolism of *ortho*-phenylphenol in mouse, rat and man. *Xenobiotica* 28(6): 579-594
- Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H** (1981) Ultrastructural investigation on the effect of parziquantel on the tegument of five species of cestsodes. *Parasitol Res* 64(3): 257-269
- Beemaert H** (1973) Determination of biphenyl and *ortho*-phenylphenol in citrus fruits by gas chromatography. *J Chromatogr* 77(2) 331-338
- Beer RYS** (1973) Studies on the biology of the life cycle of *Trichuris suis*. *Parasitol* 67: 253-262
- Bergsson G, Steingrímsson O, Thormar H** (2002) Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 20(4):258-62
- Besier RB, Lyon J, Kieran PJ** (1993) The effect of moxidectin against benzimidazole- and levamisole-resistant nematodes of sheep in Western Australia. *Aust Vet J* 70(11): 422-423
- Beveridge I, Riley MJ, Brown TH** (1990) Prevalence of resistance in sheep nematode populations to benzimidazole and levamisole anthelmintics in the high rainfall areas of South Australia. *Aust Vet J* 67(11): 413-415
- BIODIDAC**, Live cycle of the fluke *Echinostoma*, Livingstone, biodidac.bio.uottawa.ca/thumbnails/filedet.ht
- Bird AF** (1971) The structure of nematodes. Academic Press, New York, London
- Blood DC, Radosites OM** (1995) Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 8. ed., Bailliere Tindal, London
- Bolard J** (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 864: 257-304
- Bown D** (1995) Encyclopaedia of Herbs and their uses. Dorling Kindersley, London

- BPI, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie e.V.** (1999). Rote Liste 1999, Editio Cantor, Aulendorf
- Brauner L, Bukatsch F** (1980) Das kleine pflanzenphysiologische Praktikum. 9. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Buchanan JF, Fairweather I, Brennan GP, Trudgett A, Hoey EM** (2003) *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induced by treatment in-vitro with the sulphoxide metabolite of albendazole (Valbazen). *Parasitol* 126: 141-153
- Cano JH, Volpato G** (2004) Herbal mixtures in the traditional medicine of eastern Cuba. *J Ethnopharmacol* 90(2-3):293-316
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** <http://www.dpd.cdc.gov>
- Chiej R** (1984) *Encyclopaedia of Medicinal Plants*. MacDonald
- Chitwood BG** (1930) The structure of the oesophagus in the Trichuroidea. *J Parasitol* 17: 35-42
- Clark NM, May JT** (2000) Effect of antimicrobial factors in human milk on rhinoviruses and milk-borne cytomegalovirus in vitro. *J Med Microbiol* 49(8):719-23
- Coutinho E** (2002) "Gossypol: a contraceptive for men". *Contraception* 59: 259-263
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM** (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60(1): 52-60
- Dai Y, Zhou G, Kurihara H, Ye W, Yao X** (2006) Biphenyl Glycosides from the fruit of *Pyracantha fortuneana*. *J Nat Prod* 69: 1022-1024
- Dan M, Lichtenstein D, Lavochkin J** (1981) Human fascioliasis in Israel an imported case. *Isr J Med Sci* 17: 430-432
- Dayrit CS** (2000) Coconut oil in health and disease its and monolaurin's potential as cure for HIV/Aids. *Indian Coconut Journal -Cochin* 31(4) 19-24
- Dean JR** (1998) *Extraction methods for environmental analysis*. Wiley
- Douch PG, Blair SS** (1975) The metabolism of foreign compounds in the cestode, *Moniezia expansa*, and the nematode, *Ascaris lumbricoides* var *suum*. *Xenobiotica* 5(5): 279-292
- Duke JA, Wain KK** (1981) *Medicinal plants of the world*. Computer index with more than 85,000 entries. 3 Vol.
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P** (2005) Parasiten und Parasitosen - Protozoa. In: *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin* (Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H & Deplazes P, eds) Enke Verlag, Stuttgart (D); pp 26-122, 2005
- Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozental S, Silva AJR, Alviano CS** (2002) Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res Microbiol* 153:647-652
- Fahmy MAM** (1954) An investigation on the life cycle of *Trichuris muris*. *Parasitol* 44: 50-75

8. Literaturverzeichnis

- Felter HW, Lloyd JU** (1898) Oleum Cocos – Coconut Oil. King's American Dispensary
- Franke G** (1994) Nutzpflanzen der Tropen und Subtropen. Spezieller Pflanzenbau. Bd. 3, Ulmer, Stuttgart
- Frese M** (2005) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung von Emodepsid auf *Trichuris muris*. Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Fritsche T, Kaufmann J, Pfister K** (1993) Parasite spectrum and seasonal epidemiology of gastrointestinal nematodes of small ruminants in The Gambia. *Vet Parasitol* 49(2-4):271-83
- Genicot B, Mouligneau F, Lekeux P** (1991) Economic and production consequences of liver fluke disease in double-muscled fattening cattle. *J Vet Med* 38: 203-208
- Gill JH, Lacey E** (1998) Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *Int J Parasitol* 28: 863-877
- Giove Nakazawa RA** (1996) Traditional medicine in the treatment of enteroparasitosis. *Rev Gastroenterol Peru* 16(3):197-202
- Grundzinski IP, Frankiewicz-Kozko A, Bany J** (2001) Diallyl sulfide--a flavour component from garlic (*Allium sativum*) attenuates lipid peroxidation in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Phytomedicine* 8(3): 174-177
- Hakamuddin F, Paliyath G, Meckling K** (2006) Treatment of mcf-7 breast cancer cells with a red grape wine polyphenol fraction results in disruption of calcium homeostasis and cell cycle arrest causing selective cytotoxicity. *J Agric Food Chem* 27(9): 3327-36
- Harborne JB** (1984) Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. 2. ed. Chapman and Hall, London, New York
- Harder A, Samson-Himmelstjerna G** (2002) Cyclooctadepsipeptides--a new class of anthelmintically active compounds. *Parasitol Res* 88: 481-488, 2002
- Hart RJ, Turner R, Wilson RG** (1977) A biological and ultrastructural study of the mode of action of butamidine against *Hymenolepis nana*. *Int J Parasitol* 7(2): 129-134
- Hartsel SC, Hatch C, Ayenew W** (1993) How does amphotericin B work? Studies on model membrane systems. *J Liposome Res* 3: 377-408
- Hartwell JL** (1967-1971) Plants used against cancer. A survey. *Lloydia* 30-34
- Harvey A** (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today* 5(7), 294-300
- Heinisch G, Frank H** (1986) Arzneistoff-Identifizierung. Ein Analysenschema für Unterricht und pharmazeutische Praxis. Georg Thieme, Stuttgart, New York
- Henkel T** (1999) *Angew. Chem., Int Ed Engl* **38**, 643
- Hill AF** (1952) *Economic Botany*. The Maple Press
- Hosier DW, Fried B** (1991) Infectivity, Growth, and Distribution of *Echinostoma caproni* (Trematoda) in the ICR Mouse. *J Parasitol* 77(4): 640-642

8. Literaturverzeichnis

- Houghton PJ, Raman A** (1998) Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts. Chapman and Hall, London, New York
- Hüttemann M** (2004) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von *Angiostrongylus cantonensis* und *Trichuris muris* (Nematodes). Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hutchison JGP, Johnston NM, Plevey MVP, Thangkhiew I, Aidney C** (1975) Clinical trial of Mebendazole, a broad-spectrum anthelmintic. Br Med J 2(5966): 309–310
- Idris N, Fried B** (1996) Development, hatching, and infectivity of *Echinostoma caproni* (Trematoda) eggs, and histologic and histochemical observations on the miracidia. Parasitol Res 82(2): 136-142
- Igeda T** (2003) Pharmacological effects of ivermectin, an antiparasitic agent for intestinal strongyloidiasis: its mode of action and clinical efficiency. Nippon Yakurigaku Zasshi 122(6):527-538
- Jenkins T** (1969) Electron microscope observations of the body wall of *Trichuris suis*, Schrank, 1788 (Nematoda: Trichuroidea). I. The cuticle and bacillary band. Z Parasitenkd 32: 374-387
- Jenkins T** (1970) A morphological and histochemical study of *Trichuris suis* (Schrank, 1788) with special reference to the host-parasite relationship. Parasitol 61: 357-374
- Jenkins T** (1973) Histochemical and fine structure observations of the intestinal epithelium of *Trichuris suis* (Nematoda; Trichuroidea). Z Parasitenkd 42: 165-183
- Jenkins T, Erasmus D.A, Davis T.W** (1976) *Trichuris suis* and *Trichuris muris*: Elemental analysis of intestinal inclusions. Exp Parasitol 41: 464-471
- Jongsuksuntigul O, Jeradit C, Pornpattanakul S, Charanasri U** (1993) A comparative study on the efficacy of albendazole and mebendazole in the treatment of ascariasis, hookworm infections and trichuriasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 24(4): 724-729
- Kano S, Makiya K** (2001) Relationship between the prevalence of hepatic milk spots in pig and the egg density of *Ascaris suum* in Kitakyushu Municipal Meat Inspection and Control Center. J UOEH 23(3): 255-262
- Kaunitz H** (1972) Nutritional properties of coconut oil. Ceylon Cocon Q 23 (3-4): 85-92
- Kaur M, Sood ML** (1990) In vitro effect of albendazole and fenbendazole on the histochemical localization of some enzymes of *Trichuris globulosa* (Nematoda: Trichuridae). Angew Parasitol 33: 33-45
- Kearn GC** (1998) Parasitism and the Plathelminthes. Chapman & Hall
- Kluge K, Ungemach FR** (1998) Neue Arzneimittel für Pferde und landwirtschaftliche Nutztiere und Veränderungen auf dem Arzneimittelmarkt seit 1996. Tierärztl Prax 16 (G): 301-306
- Krishnankutty S, Thampan PK, Markose VT, Pankajakshan AS, Edachal M, Nandakumar TB** (Eds.) (1987) Processing and Marketing of Coconuts in India. Coconut Development Board, Ministry of Agriculture, Government of India, Kochi :70-76

8. Literaturverzeichnis

- Kuhnert N** (1999) *Hundert Jahre Aspirin*. In: *Chemie in unserer Zeit*. Bd. 33, Nr. 4, S. 213-220
- Lee DL, Wright KA** (1978) The morphology of the attachment and probable feeding site of the nematode *Trichuris muris* (Schrank, 1788) Hall (1916). *Can J Zool* 56: 1889-1905
- Löscher W, Ungemach FR, Kroker R** (1999) *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 7. Aufl. Parey Berlin
- Macchi C, Morris RS, Pfeiffer DU, Beckett S** (1999) Economic evaluation of three anthelmintic strategies for lamb flocks affected by benzimidazole-resistant nematodes. *Aust Vet J* 77(10): 674-677
- MacDonald D, VanCrey K, Harrison P, Rangachari PK, Rosenfeld J, Warren C, Sorger G** (2004) Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 92(2-3): 215-221
- Mackenstedt U, Schmidt S, Mehlhorn M, Stoye M, Traeder W** (1993) Effects of pyrantel pamoate on adult and preadult *Toxocara canis* worms: an electron microscope and audiography study. *Parasitol Res* 79: 567-578
- Mackerras MJ, Sandars DF** (1955) The life history of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae). *Aust J Zool* 3: 1-25
- MacKinnon BM, Burt MDB** (1992) Functional morphology of the female reproductive tract of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda) raised in vivo and in vitro. *Zoomorphology* 112: 237-245
- Maggenty A** (1981) *General nematology*. Springer-Verlag, New York
- Marangi M, Zechini B, Fileti A, Quaranta G, Aceti A** (2003) *Hymenolepis diminuta* infection in a child living in the urban area of Rome, Italy. *J Chin Microbiol* 41(8): 3994-3995
- Martin J, Lee DL** (1980) Observation on the structure of the male reproductive system and spermatogenesis of *Nematodirus battus*. *Parasitol* 81: 579-586
- Martinez JM, Beltran MC** (1999) Estudio sobre la flora medicinal y condimenticia de Cuba. *Rev Agri Organica* 1
- Maudinas B, Oelze J, Villoutreix J, Reisinger O** (1973) The influence of 2-hydroxybiphenyl on membranes of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Microbiol* 93: 219-228
- McCracken RO, Lipowitz KB, Dronen NO** (1992) Efficacy of albendazole and mebendazole against *Hymenolepis microstoma* and *Hymenolepis diminuta*. *Parasitol Res* 78: 108-111
- McFarland JW, Howes HL** (1972) Novel anthelmintic agents. 6. Pyrantel analogs with activity against whipworm. *J Med Chem* 15(4): 365-368
- McLaren DJ** (1972) The structure and development of the spermatozoon of *Dipetalonema vitae* (Nematoda: Filarioidea). *Parasitol* 66: 447-463
- Mehlhorn H, Ruthmann A** (1992) *Allgemeine Protozoologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart
- Mehlhorn B, Mehlhorn H** (1993) *Gesunde Katzen, Schmusen ohne Gefahr*. Springer Verlag

- Mehlhorn H, Düwel D, Raether W** (1993) Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Aufl. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York
- Mehlhorn H, Harder A** (1997) Effects of the synergistic action of febantel and pyrantel on the nematode *Heterakis spumosa*: a light and transmission electron microscopy study. Parasitol Res 83: 419-434
- Mehlhorn H, Piekarski G** (1998) Grundriss der Parasitenkunde. 5. Aufl., Gustav Fischer Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm
- Mehlhorn H** (2001) Encyclopedic reference of parasitology disease, treatment, therapy. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Meksongsee LA, Clawson AJ, Smith FH** (1970) The in vivo effect of gossypol on cytochrome oxidase, succinoxidase, and succinic dehydrogenase in animal tissue. J Agr Food Chem 18(5) 917
- Mendonca-Filho RR, Rodrigues IA, Alviano DS, Santos ALS, Soares RMA, Alviano CS, Lopes AHCS, Rosa MS** (2004) Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). Res in Microbiol 155: 136-143
- Messner B, Thulke O, Schäffner AR** (2003) Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. Planta 217:138-146
- Muller R, Wakelin D** (2002) Worms and Human Disease. 2nd Ed., CABI Publishing
- Nadkarni KM** (1976) Indian Materia Medica. 3rd edn. Vol. 1 & 2. Bombay: Popular Prakashan
- Nollen PM** (1996) Mating behaviour of *Echinostoma caproni* and *E. paraensei* in concurrent infections in mice. J Helmintol 70(2): 133-136
- Oh DH, Marshall DL** (1996) Monolaurin and acetic acid inactivation of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. J Food Prot 59(3):249-52
- Ohler JG** (1999) Modern Coconut management. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, pp. 458
- Olsen OW** (1974) Animal Parasites, their life cycles and ecology. 3rd ed, University Park Press, Baltimore, London, Tokyo
- Panesar TS** (1981) The early phase of tissue invasion by *Trichuris muris* (Nematoda: Trichuroidea). Z Parasitenkd 66: 163-166
- Parotta JA** (1993) *Cocos nucifera* L. Palma de coco, coco, coconut palm, Palmae, Familia de las palmas. SO-ITFSM-57. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.
- Persley GJ** (1992) Replanting the tree of life: towards and international agenda for coconut palm research. C.A.B. International, Wallingford, U.K., pp 156
- Peterson ML, Schlievert PM** (2006) Glycerol monolaurate inhibits the effects of Gram-positive select agents on eukaryotic cells. Biochemistry 45(7):2387-97

8. Literaturverzeichnis

- Piekarski G** (1987) Medizinische Parasitologie in Tafeln. 3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Tokyo
- Pouchert CJ, Behnke J** (1993) The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra. Aldrich Chemical Company Inc. Vol. 13
- Pradera ES, Fernandez E, Calderin O** (1942) Coconut water - A clinical and experimental study. Amer J Dis Child 45: 977-996
- Preston C.M, Jenkins T** (1982) Ultrastructural studies of early stages of oogenesis in a trichuroid nematode, *Trichuris muris*. Int J Invertebr Repro 6: 77-91
- Prociw P, Spratt DM, Carlisle MS** (2000) Neuro-angiostrongyliasis unresolved issues. Int J Parasitol 30: 1295-1303
- Prociw P** (1999) Parasitic meningitis: Crossing paths with the rat lungworm (*Angiostrongylus cantonensis*). Med J Aust 170: 517-518
- Rajasekaviah GR, Deb BN, Jones MP, Dhage KR, Bose S** (1991) Response of pre-adult and adult stages of *Trichuris muris* to common anthelmintics in mice. Int J Parasitol 21(6): 697-702
- Razakantoarina V, Phung NKP, Jaureguiberry G** (2000) Antimalarial activity of new gossypol derivatives. Parasitol Res 86(8): 665-668
- Reich E, George T** (1997) Method development in HPTLC. J Planar Chromatogr 10: 273-280
- Reinemeyer CR, Charles S** (2003) Evaluation of efficacy of a combination of imidacloprid and Moxidectin against immature *Toxocara cati* in cats. Parasitol Res 90: 140-141
- Reynolds SG** (1988) Pastures and cattle under coconuts. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, pp. 321
- Richard J, Brygoo ER** (1978) Life cycle of the trematode *Echinostoma caproni* Richard, 1964 (Echinostomatoidea). Ann Parasitol Hum Comp 53(3): 265-275
- Richards CS, Merritt JW** (1967) Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in molluscan intermediate hosts. J Parasitol 53: 282-388
- Rikihisa Y, Lin YC, Garber PI, Gu Y** (1990) *Taenia taeniaeformis*: inactivation of metacestodes by gossypol in vitro. Exp Parasitol 71(2): 135-145
- Roepke DA** (1996) Traditional and re-applied veterinary medicine in east Africa. In: McCorkle CM, Mathias E, Schillhoern van Veen TW eds. Ethnoveterinary res and devel. London, Intermediate Technol Publ.
- Romero MC, Hammer E, Hanschke R, Arambarri AM, Schauer F** (2005) Biotransformation of biphenyl by the filamentous fungus *Talaromyces helicus*. World J Microbiol Biotechnol 21: 101-106
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Boch J, Supperer R** (2006) Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. Aufl., Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien

8. Literaturverzeichnis

- Rosen L, Chapell R, Laqueur GL, Wallace CD, Weinstein PP** (1962) Eosinophilic meningoencephalitis caused by a metastrongylid lungworm of rats. *J Am Med Assoc* 179: 620-624
- Roy TK, Srivastava VML, Mohan Rao VK** (1981) Nonspecific binding of levamisole with proteins of cuticle-hypodermis-muscle system of adult female *Asacridia galli*. *Int J Exp Biology* 19: 379-385
- Rybaltivskii OV** (1966) On the discovery of cucurbitin--a component of pumpkin seed with anthelmintic action. *Med Parazitol (Mosk)* 35(4):487-8
- Santoso U, Kubo K, Ota T, Tadokoro T, Maekawa A** (1996) Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chemistry* 57 (2): 299-304
- Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, Yoshida K, Nishidate E, Su YQ, Matsusaka N, Tsuda S** (1997) In vivo genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 395(2-3): 189-198
- Schwedt G** (1994) Chromatographische Trennmethode. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. 3. Aufl. Georg Thieme Stuttgart, New York
- Schweitzer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson P** (2003b) Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Vet Record*, im Druck
- Sekine T, Hasegawa Y** (1977) Solvent extraction chemistry:- Fundamentals and Applications. Maral Denker Inc, New York
- Seow CC, Gwee CN** (1997) Coconut milk: chemistry and technology. *Int J Food Sci Technol* 32: 189-201
- Sheffield HG** (1963) Electron microscopy of the bacillary band and stichosome of *Trichuris muris* and *T. vulpis*. *J Parasitol* 49: 998-1009
- Shi S, Jiang D, Dong C, Tu P** (2006) New Phenolic Glycosides from *Clematis mandshurica*. *Helv Chim Acta* 89(5): 1023-1029
- Shivashankar S** (1991) Biochemical changes during maturation in coconut. *J Plantation Crops* 19(2): 102-119
- Smyth JD** (1994) Introduction to animal parasitology. Cambridge, University Press
- Stewart TB, Hale OM** (1988) Losses to internal parasites in swine production. *J Anim Sci* 66(6): 1548-54
- Still WC, Kahn M, Mitra A** (1978) Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem* 43(14): 2923
- Stoitsova SR, Gorchilova LN, Danek J** (1992) Effects of three anthelmintics on the tegument of *Hymanolepis fraterna* (Cestoda). *Parasitol* 104: 143-152
- Straßen B** (2002) Experimentelle Untersuchungen zur Entwicklung von *Trichostrongylus colubriformis*. Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Sun CQ, O'Connor CJ, Roberton AM** (2003) Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. FEMS Immunol Med Microbiol 36(1-2): 9-17
- Tilney LG, Connelly PS, Guild GM, Vranich KA, Artis D** (2005) Adaption of a nematode parasite to living within the mammalian epithelium. J Exp Zool 30(A): 927-945
- Van der Bossche H, De Nollin S** (1973) Effects of mebendazole on the absorption of low molecular weight nutrients by *Ascaris suum*. Int J Parasitol 3: 401-407
- Verhoeven HL, Willemsen G, Van den Bossche H** (1976) Uptake and distribution of Levamisole in *Ascaris suum*. Biochemistry of parasites and host – parasite relationships. Ed. Van der Bossche H. North Holland, Amsterdam. 573-579
- Vincent AL, Porter DD, Ash LR** (1975) Spontaneous lesions and parasites of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. Lab Anim Sci 25 (6): 711-722
- Wakelin D** (1969) The development of early larvae stages of *Trichuris muris* in the albino laboratory mouse. J Helminthol 43: 427-436
- Wall ME, Wani M, Brown DM** (1996) Effects of tannins on screening of plant extracts for their enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. Phytomed 3 (4): 281-285
- Watzl B, Leitzmann C** (1999) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. 2. Aufl. Hippokrates, Stuttgart
- Weinstein PP, Rosen L, Laqueur GL, Sawyer TK** (1963) *Angiostrongylus cantonensis* infection in rats and rhesus monkeys, and observation on the survival of the parasite in vitro. Am J Trop Med Hyg 12: 358-377
- Wenrich DH** (2005) Structure and division of *Trichomonas muris* (Hartmann). J Morphol 36(1): 119-155
- Woodroof JG** (1979) Coconuts: producing, processing, products. 2nd ed. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, pp. 307
- Wright KA** (1968) The fine structure of bacillary band of *Trichuris myocastoris*. J Parasitol 54: 1106-1110
- Yamashita K, Janout V, Bernhard EM, Armstrong D, Regen SL** (1995) Micelle/Monomer control over the membrane-disrupting properties of an amphiphilic antibiotic. J Am Chem Soc 117(23): 6249-6253
- Zajak AM** (2006) Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 22(3):529-41
- Zou J, Jin D, Chen W, Wang J, Liu Q, Zhu X, Zhao W** (2006) Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors from *Calophyllum membranaceum*. J Nat Prod 69(9): 1370-1373

9. Abkürzungsverzeichnis

A	After
AN	Anus
BB	Bacillary Band
BC	Bacillary Cell
BL	Basallamina
BS	Bauchsaugnapf
D	Darm
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DE	Darmepithel
EI	Ei
EL	längsverlaufender Exkretionskanal
GÖ	Geschlechtsöffnung
H	Hypodermis
HK	Hakenkranz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K	Kutikula
KL	Kloake
KM	Kontraktile Muskulatur
LP	Lippen
M	Muskel
m/z	Masse-zu-Ladungs Verhältnis, Mass-Charge Ratio
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MF	Myosinfilamente
MI	Mitochondrion
min	Minute
MO	membranöse Organellen
MS	Mass Spectrometry, Massenspektrometrie
MS	Mundsaugnapf
MU	Muskelzelle
N	Nerv
NK	nichtkontraktiler Bereich der Muskelzelle
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanz-Spektroskopie
NU	Nukleus

9. Abkürzungsverzeichnis

OG	Oogonien
ÖS	Oesophagus
OZ	Oozyten
PEG	Polyethylenglycol
PK	Polkörper
PÖ	Porenöffnung
ppm	Parts per Million
Rf	Retentionsfaktor
RH	Rostaler Hakenkranz
RP	Reversed Phase, Umkehrphase
S	reife Spermien
SD	Spermatiden
SG	Spermatogonien
SP	Spiculum
SS	Spiculum-Scheide
ST	Stichostom
SU	Saugnapf
SZ	Spermatozyten
T	Tegument
TP	Trichterförmige Papillen
U	Uterus
UE	Uterusepithel
UV	Ultraviolett
VU	Vulva
ZF	Zertifikal Flügel
ZNS	Zentralnervensystem

Abb. 1-5 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Totalpräparate von *Trichuris muris***

Abb. 1 Übersichtsaufnahme eines adulten Männchens mit eingerolltem Hinterende (oben) und eines adulten Weibchens. Typisch ist die peitschenähnliche Gestalt mit einem langen, dünnen Vorderende.

Abb. 2 Detailaufnahme des Kopfbereiches mit trichterförmigen Papillen (TP) auf der Oberfläche.

Abb. 3a Übersichtsaufnahme eines unembryonierten Eies. Typisch ist die ovale Form mit zwei Polkörpern an den Enden.

Abb. 3b Übersichtsaufnahme eines infektiösen Eies mit einer L1-Larve.

Abb. 4 Wirtsgewebe eines mit *Trichuris muris* befallenen Gerbils (*Meriones unguiculatus*).

Abb. 5 Semidünnschnitt durch befallenes Caecumgewebe. Deutlich erkennbar sind das Bacillary Band (BB) und die Stichosomzelle (ST), des mit dem Vorderende im Gewebe verankerten Adultwurmes.

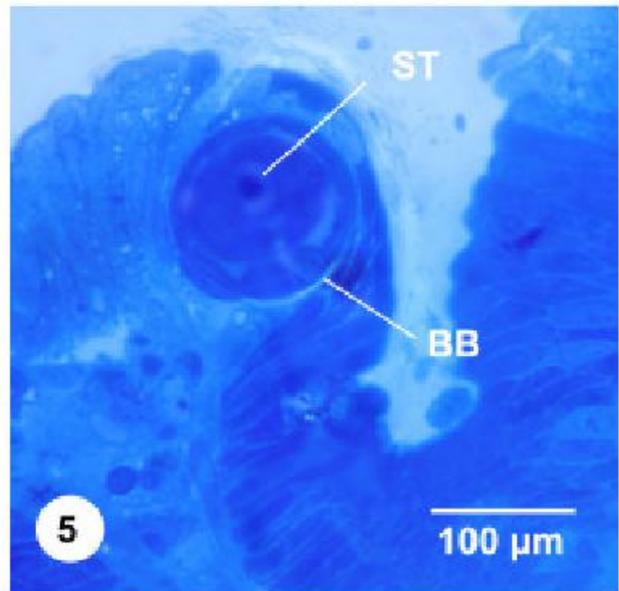
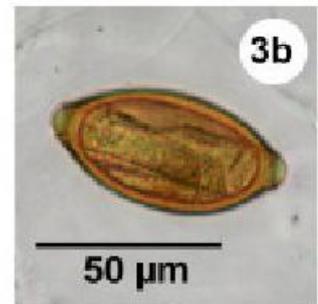
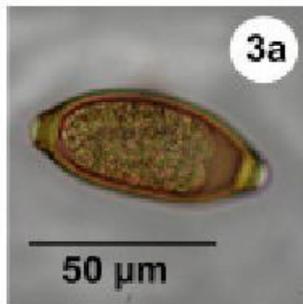
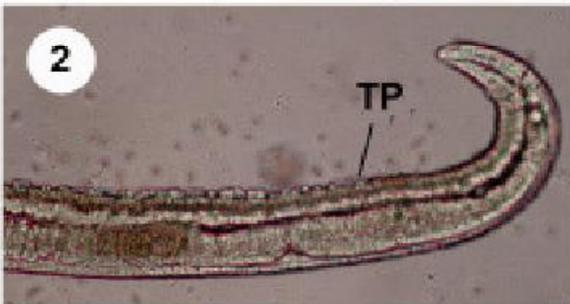
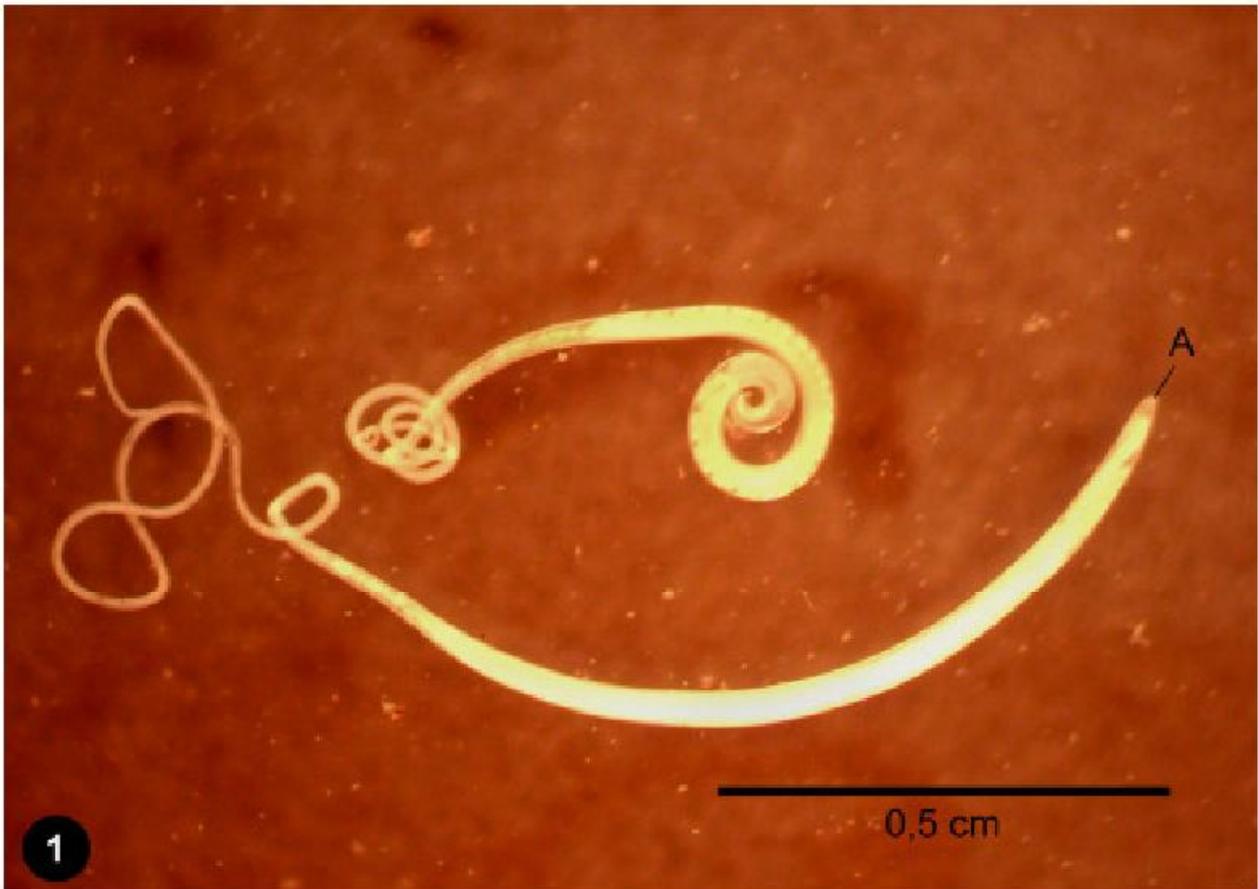


Abb. 6-11 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Totalpräparate von *Trichuris muris***

Abb. 6 Männchen, Kontrolle
Detailansicht des eingerollten Hinterendes mit Spiculum (SP) und Samenblase.

Abb. 7 Männchen, Kontrolle
Der Hodenschlauch nimmt nahezu den gesamten Querschnitt des Wurmes ein.

Abb. 8 Männchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Der Hodenschlauch wirkt etwas zusammengefallen. Die abschließende Basallamina ist an einigen Stellen deformiert (Pfeil).

Abb. 9 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Der Hodenschlauch ist in seinem Durchmesser geschrumpft, die abschließende Basallamina wirkt stark deformiert.

Abb. 10 Weibchen, Kontrolle
Detailansicht des mit Eiern gefüllten Uterus (U).

Abb. 11 Weibchen, Kontrolle
Ovar mit lückenlos aneinander liegenden Oozyten (OZ).

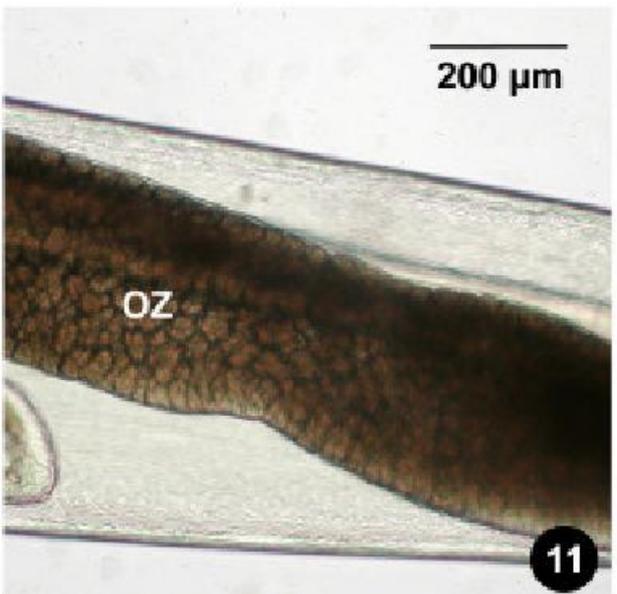
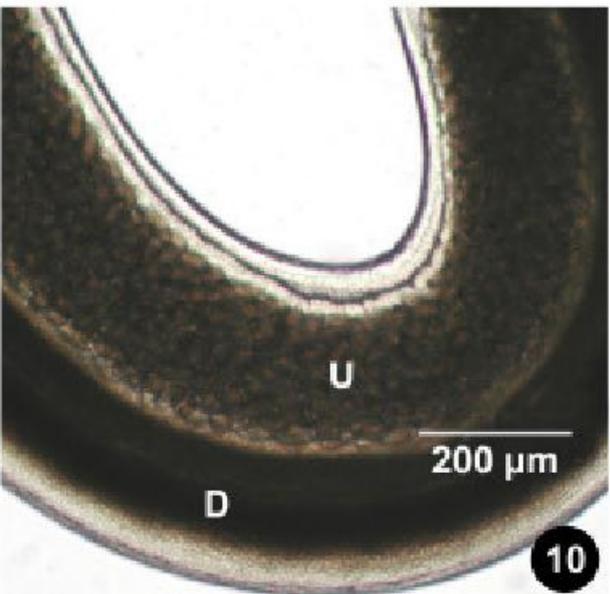
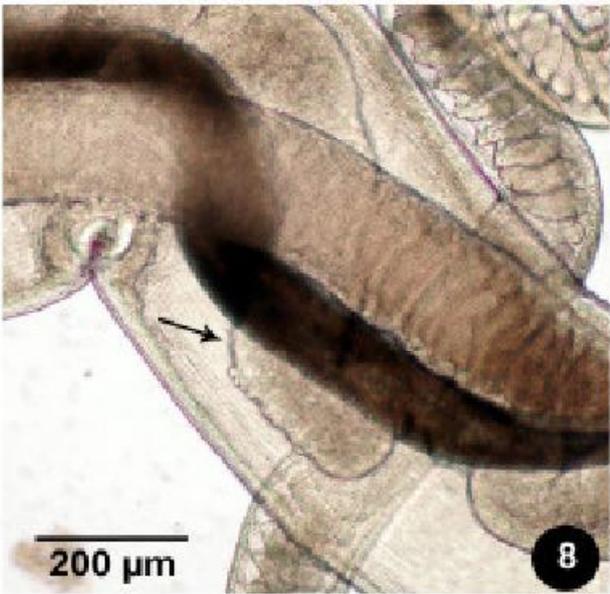
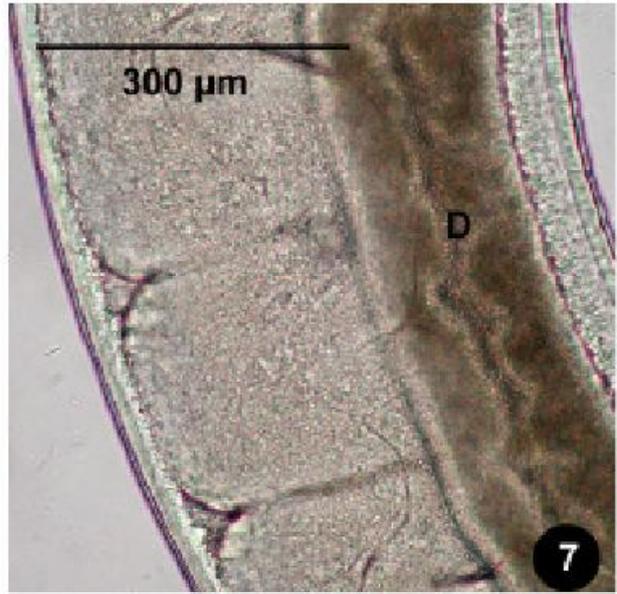
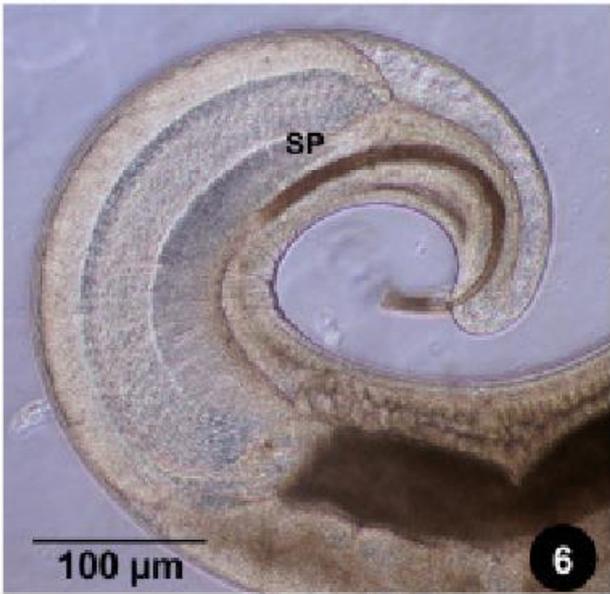


Abb. 12-14 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Totalpräparate von *Trichuris muris***

Abb. 12 Weibchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Zwischen den Oozyten (OZ) haben sich kleine Zwischenräume gebildet (Pfeil).

Abb. 13 Weibchen, 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Die Basallamina liegt nicht mehr dicht um die Oozyten. Die Oozyten haben sich in vielen Bereichen voneinander getrennt.

Abb. 14 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Uterus und Ovar erscheinen vollkommen deformiert. Weder Eier noch Oozyten sind als Strukturen erkennbar.

Abb. 15-16 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte von *Trichuris muris***

Abb. 15 Weibchen, Kontrolle
Querschnitt durch die Muskulatur. Erkennbar sind die kontraktile Bereiche (KM) mit den Filamenten und die nichtkontraktile Bereiche (NK) der Muskelzellen.

Abb. 16 Weibchen, Kontrolle
Querschnitt durch den ventralen Nervenstrang. Die nichtkontraktile Ausläufer der Muskelzellen (NK) ziehen zum ventralen Nervenstrang (N).

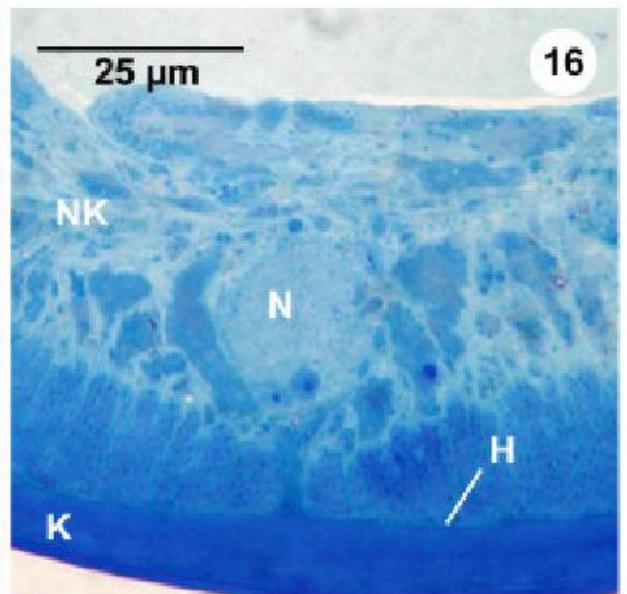
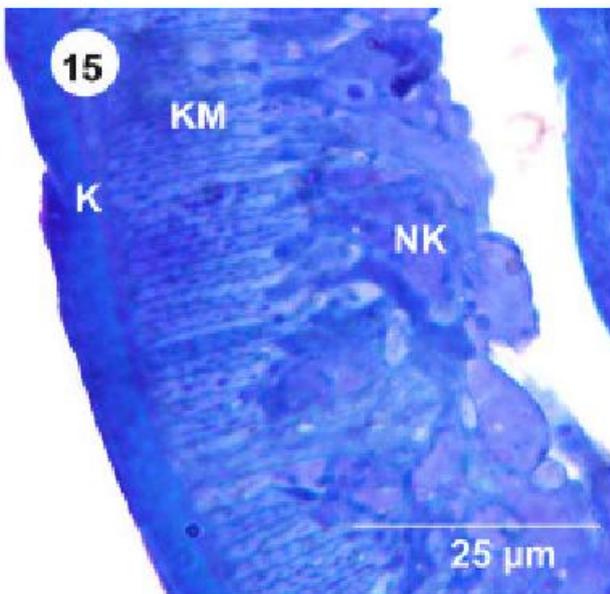
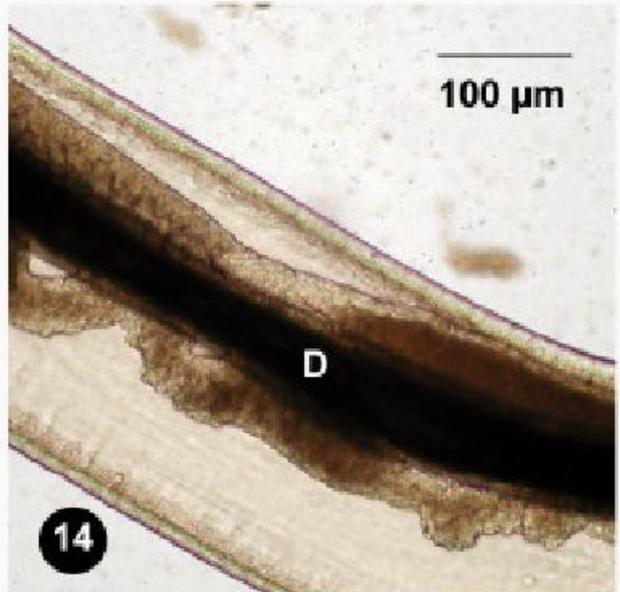
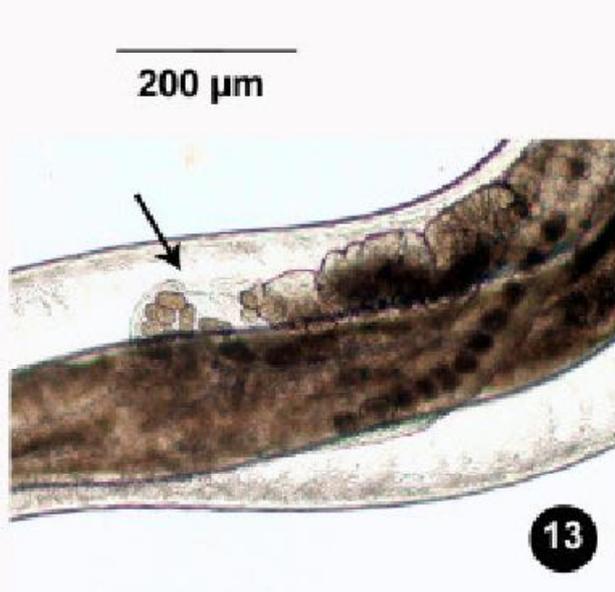
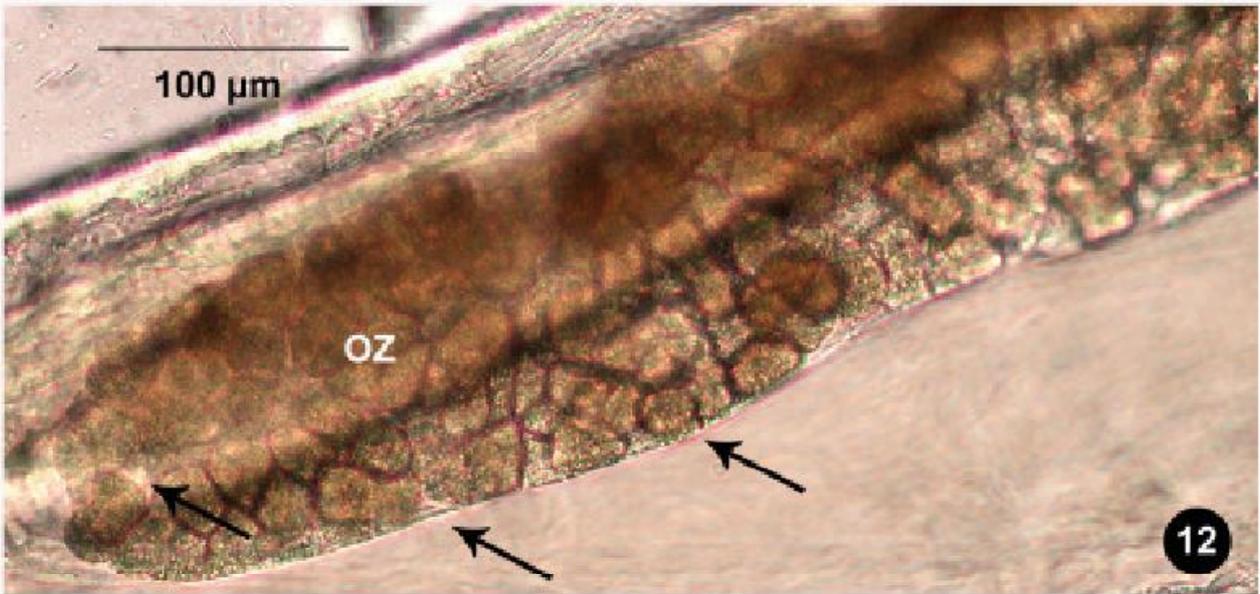


Abb. 17-21 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte von *Trichuris muris***

Abb. 17 Weibchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den ventralen Nervenstrang. Im Nervenstrang (N) sind kleine Vakuolen sichtbar (Pfeil). Muskulatur, Hypodermis und Kutikula erscheinen unverändert.

Abb. 18 Männchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den dorsalen Nervenstrang. Die Vakuolisierung des Nervenstranges (N) ist deutlich sichtbar (Pfeil). Zwischen der Hypodermisleiste hat sich ein Spalt gebildet. In einigen Bereichen erscheint die nichtkontraktile Muskulatur (NK) lysiert. Hypodermis und kontraktile Muskulatur sind unverändert. Die Kutikula erscheint dachziegelartig.

Abb. 19 Weibchen, 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den dorsalen Nervenstrang. Der Nervenstrang (N) ist stark vakuolisiert. Der Bereich zwischen Muskelzellen (M) und Nerv ist vollkommen aufgelöst. Die Kutikula erscheint dachziegelartig.

Abb. 20 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch die Nervenleiste (N). Die Axone erscheinen stark vakuolisiert. Die Hypodermis (H) hat sich von Muskulatur (M) und Kutikula (K) getrennt.

Abb. 21 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch die Nervenleiste. Der Nervenstrang (N) erscheint stark vergrößert. Große Bereiche der Axone sind vakuolisiert. Zwischen den nichtkontraktilen Muskelzellen (KM) haben sich Freiräume gebildet. Die Kutikula (K) erscheint dachziegelartig.

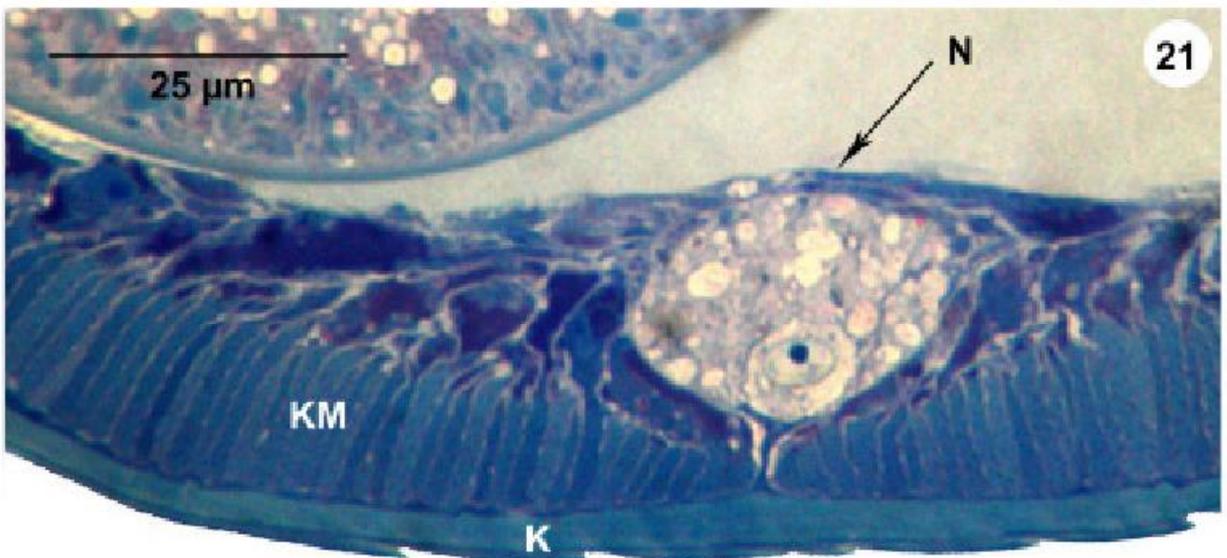
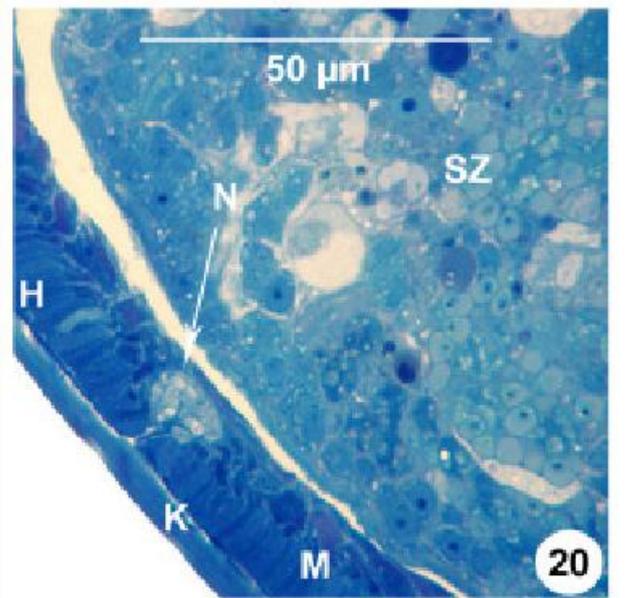
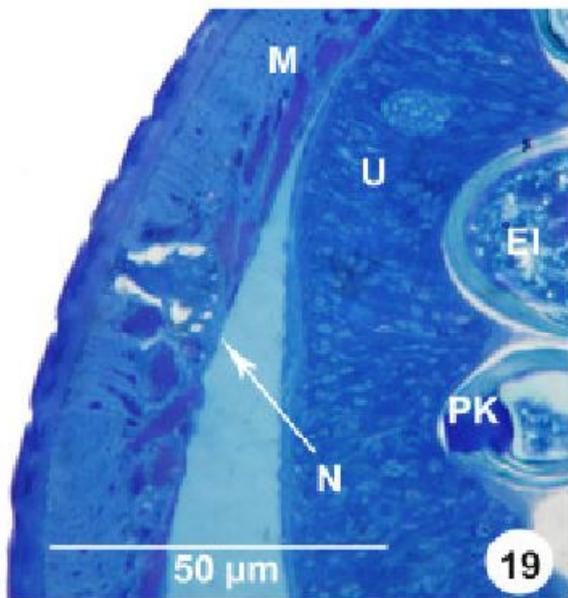
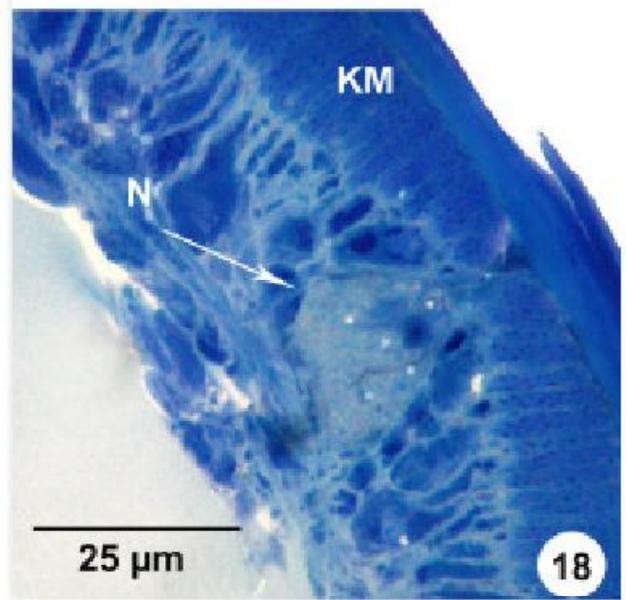
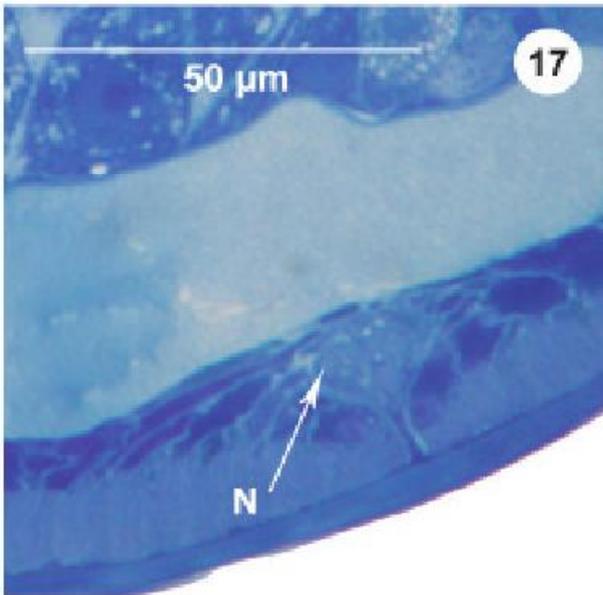


Abb. 22-27 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 22 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Ösophagusbereich. Die Hypodermis hat sich an einigen Stellen von Muskulatur (M) und Kutikula gelöst. Die nichtkontraktilen Muskelzellen (NK) sind massiv geschädigt und an vielen Stellen vollständig aufgelöst. Der Nervenstrang (N) erscheint vakuolisiert. Im Bereich der Stichosomzelle (ST) ist die umgebende Basallamina (BL) gefaltet.
- Abb. 23 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Ösophagusbereich. Muskulatur und Hypodermis haben sich teilweise voneinander gelöst. Der nichtkontraktile Bereich (NK) der Muskulatur ist vollständig aufgelöst. Die Basallamina (BL) hat sich vom Stichosom (ST) gelöst.
- Abb. 24 Weibchen, Kontrolle
Querschnitt durch das Darmepithel mit Mikrovillisaum (MV), der das Darmlumen (L) umgibt.
- Abb. 25 Weibchen, 0,2 g Chloroformphase
Darmepithel (DE) und die umgebende Basallamina (BL) erscheinen unverändert.
- Abb. 26 Weibchen, 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Das Darmepithel (DE) weist Vakuolen auf, die abschließende Basallamina erscheint jedoch unverändert. Die kontraktile und nichtkontraktile Muskulatur (M) ist in vielen Bereichen massiv geschädigt.
- Abb. 27 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Das Darmepithel ist deutlich vakuolisiert. Schäden an der Basallamina sind nicht erkennbar.

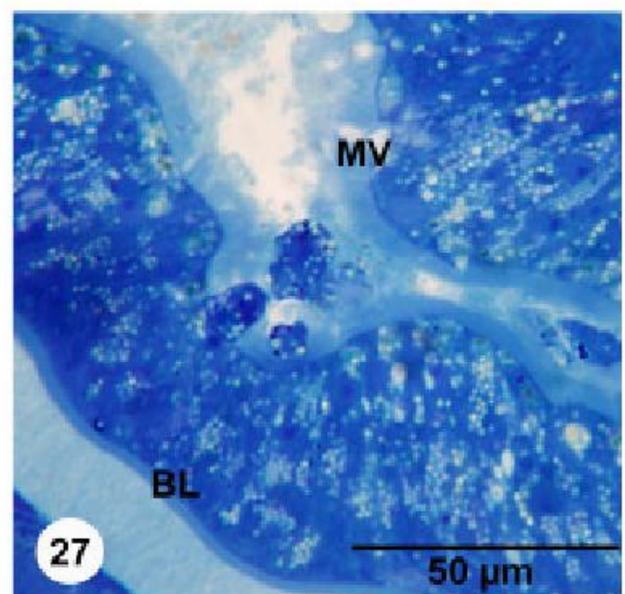
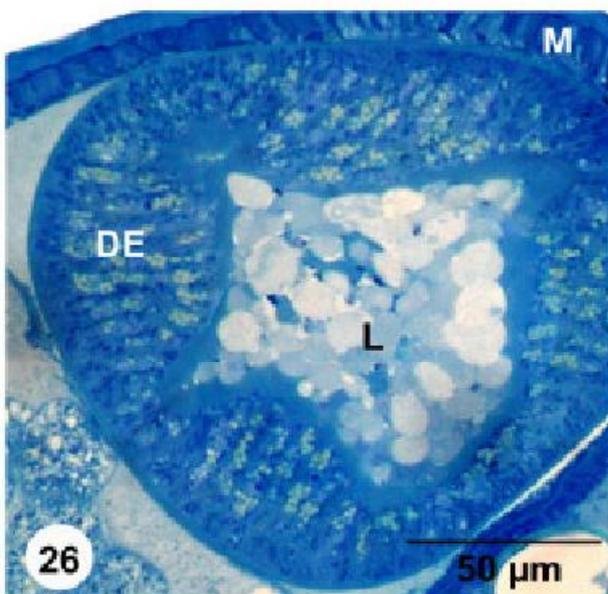
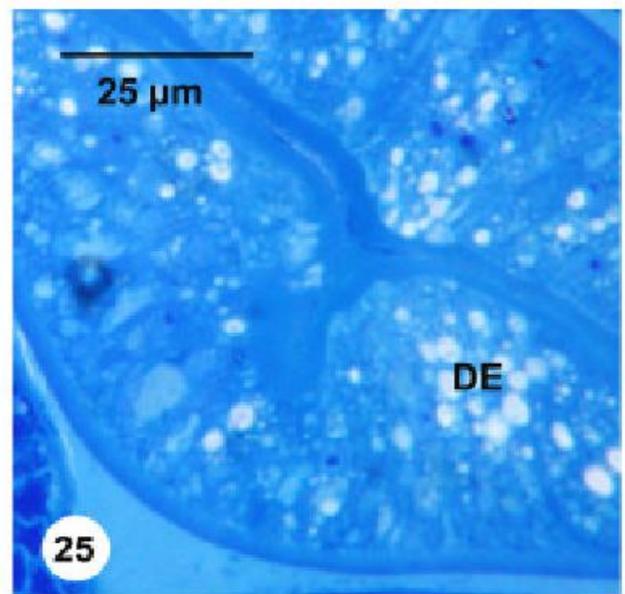
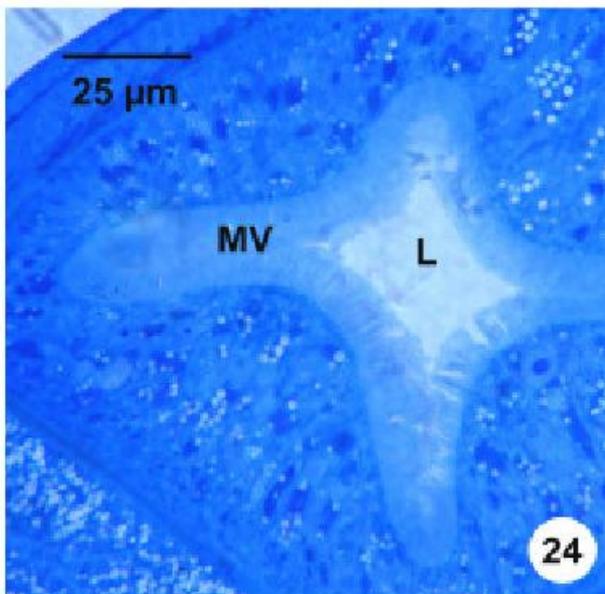
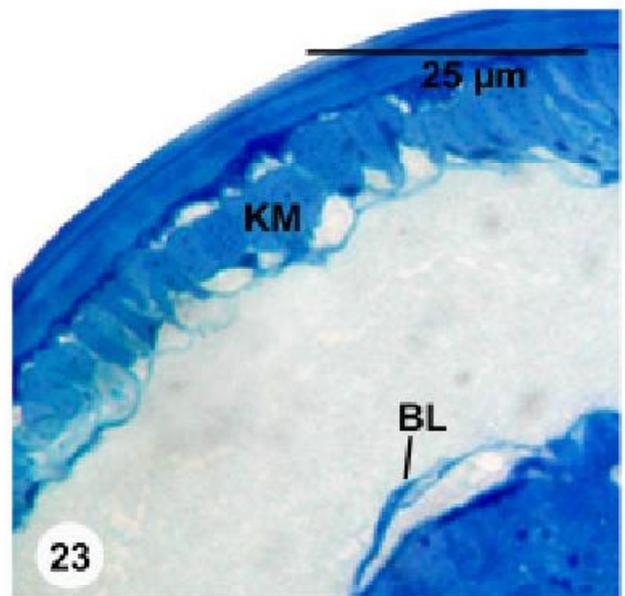
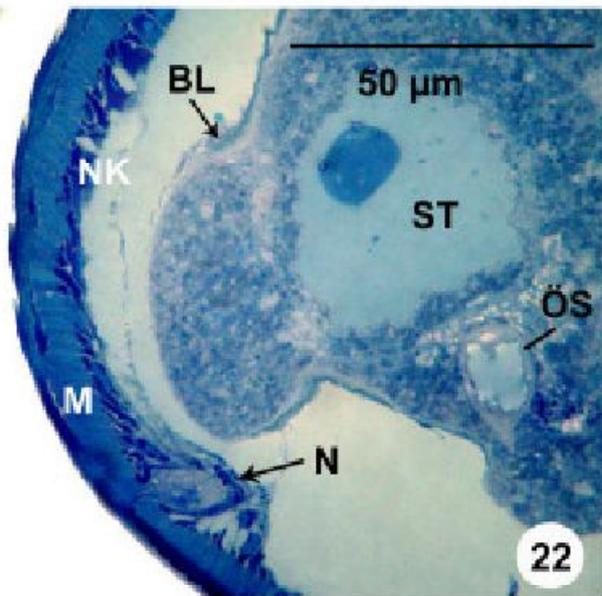


Abb. 28-33 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte von *Trichuris muris***

Abb. 28 Weibchen, Kontrolle
Querschnitt durch den Uterus mit ovalen Eiern, bei denen die Eischale noch nicht vollständig ausgebildet ist.

Abb. 29 Weibchen, Kontrolle
Querschnitt durch das Ovar mit befruchteten Oozyten (OZ) , die dicht aneinander liegen und durch eine Basallamina nach außen abgegrenzt sind.

Abb. 30 Weibchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Uterus. Die aufliegende Basallamina (BL) erscheint deformiert. Von den unfertigen Eiern hat sich die Vitellinschicht abgelöst.

Abb. 31 Weibchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Ovar. Es haben sich zwischen den Oozyten Zwischenräume gebildet. Die Basallamina (BL) hat sich an einigen Stellen aufgelöst.

Abb. 32 Weibchen, 0,4 g Chloroformphase
Querschnitt durch den weiblichen Geschlechtsapparat. Die Basallamina (BL) des Ovars hat sich deutlich geweitet. Der enge Zellverband der Oozyten II (OZ II) hat sich aufgelöst (Pfeile). Keine Freiräume sind zwischen den Oogonien (OG) und Oozyten I (OZ I) erkennbar. Sowohl die kontraktilen als auch die nichtkontraktilen Bereiche der Muskelzellen (M) sind stark lysiert.

Abb. 33 Weibchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht der geschädigten Basallamina des Ovars.

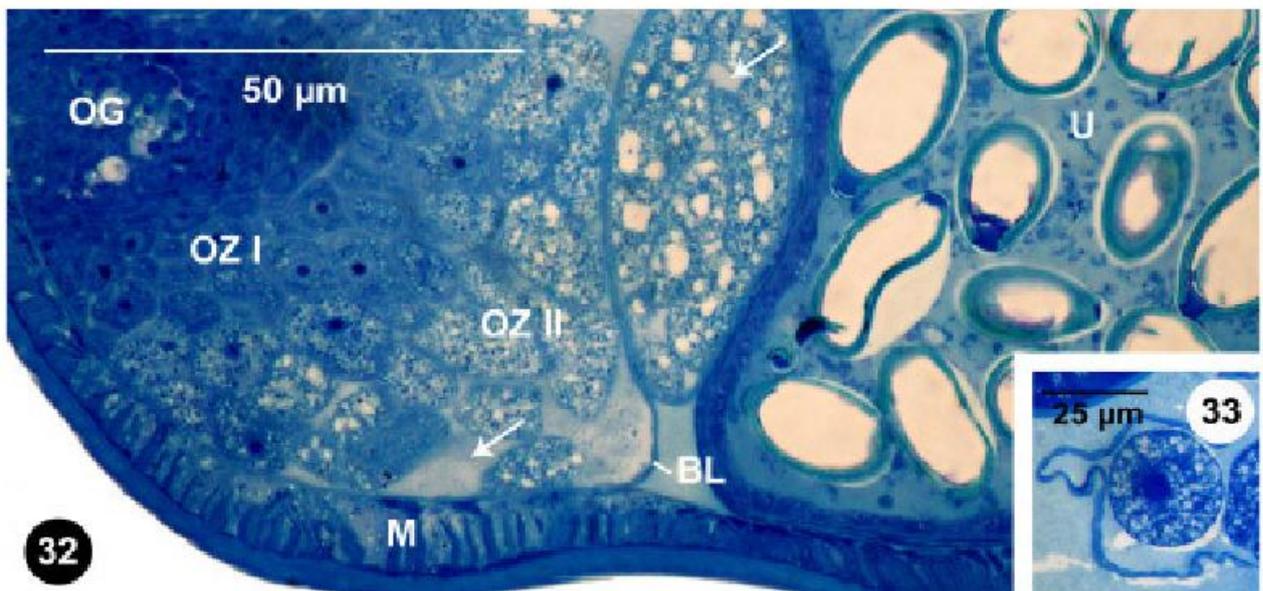
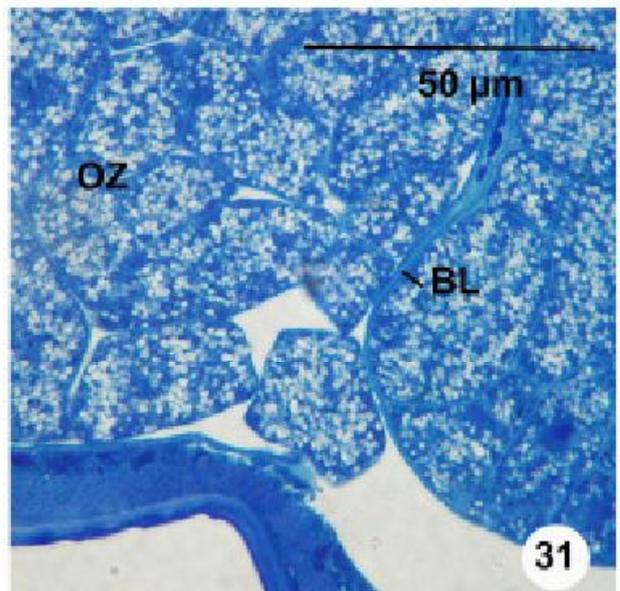
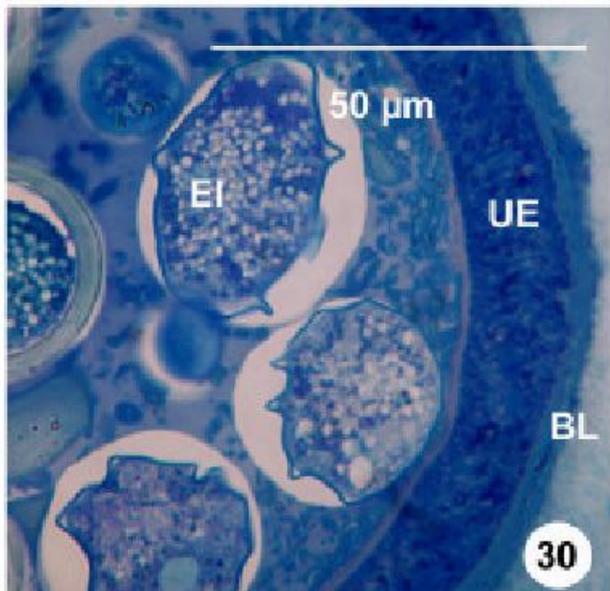
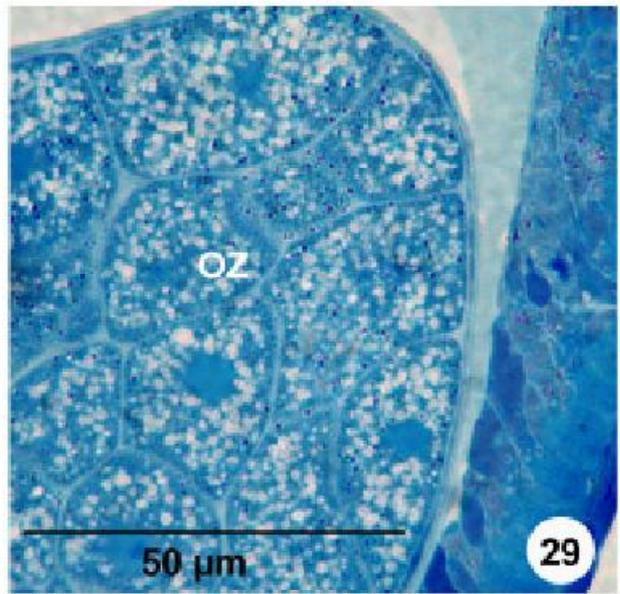
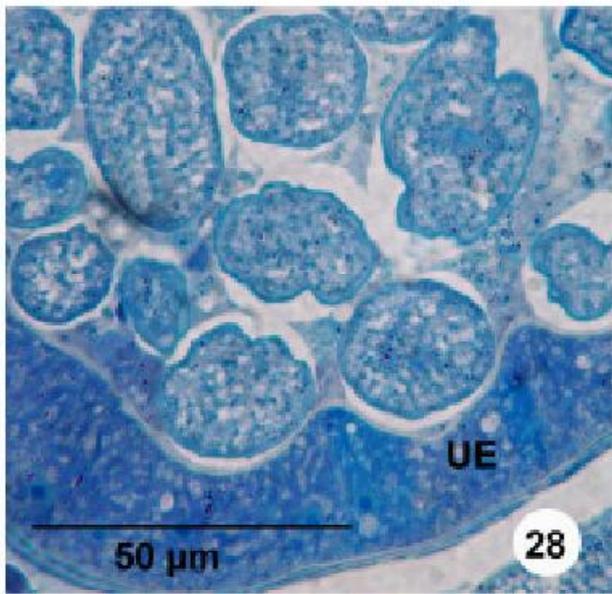


Abb. 34-38 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 34 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Ovar. Die Basallamina (BL) ist massiv geschädigt. Eine Auftrennung in Einzelmembranen ist deutlich sichtbar. Der intrazelluläre Matrixraum erscheint stark lysiert (Pfeil), wodurch die Oozyten (OZ) nicht mehr im engen Zellverband liegen.
- Abb. 35 Männchen, Kontrolle
Querschnitt durch den mit Spermatozyten (SZ) gefüllten Hodenschlauch.
- Abb. 36 Männchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Hodenschlauch. Die Spermatozyten erscheinen stark vakuolisiert (Pfeile).
- Abb. 37 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Hodenschlauch. Die Spermatozyten (SZ) sind stark vakuolisiert. Die Axone des Nervenstrangs (N) erscheinen ebenfalls stark vakuolisiert. Die reifen Spermien (S) in der Samenblase sind unverändert (Kleines Bild).
- Abb. 38 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Hodenschlauch. Die Spermatozyten (SZ) und die umgebende Basallamina (BL) erscheinen massiv geschädigt.

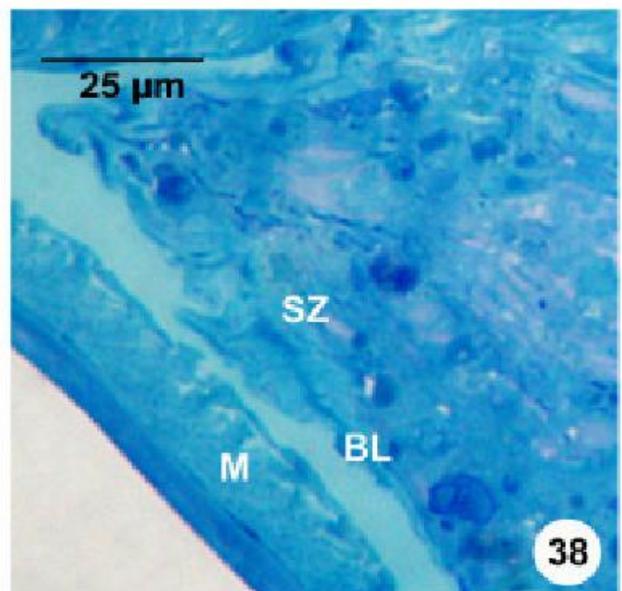
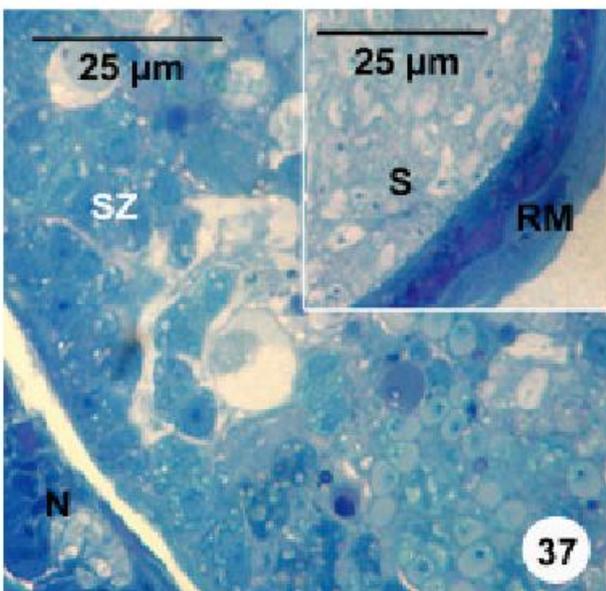
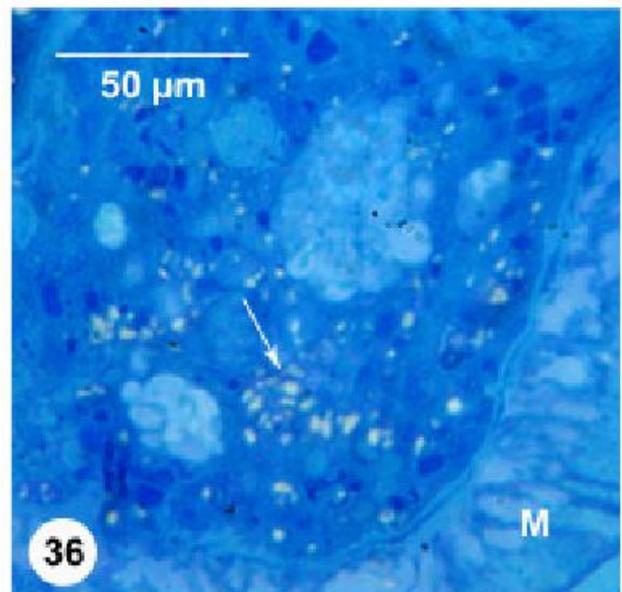
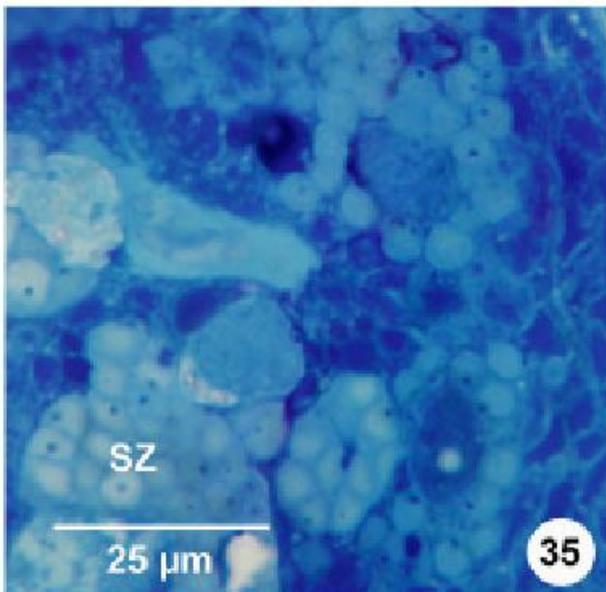
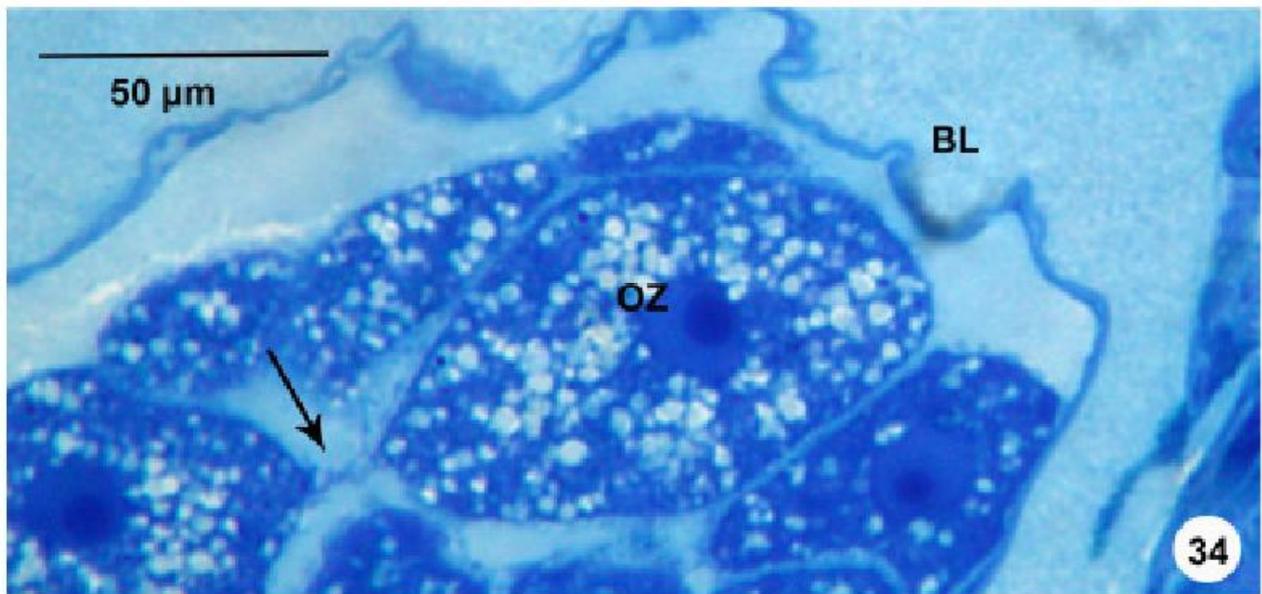


Abb. 39-40 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Totalpräparate von
*Hymenolepis diminuta***

Abb. 39 Kontrolle
Scolex und Proglottiden eines Cestoden.

Abb. 40 0,1 g CHLO_1/kg KGW Ratte
Totalansicht eines Cestoden aus einer behandelten Ratte, dem die reifen Proglottiden fehlen (vergleichbar mit *H. microstoma*).

Abb. 41-44 **Lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte von
*Hymenolepis microstoma***

Abb. 41 Kontrolle
Querschnitt durch die Proliferationszone mit längsverlaufenden Exkretionskanälen (EL).

Abb. 42 1 mg Fraktion 4, 15 Minuten Inkubationszeit
Querschnitt durch die Proliferationszone. Das Tegument (T) erscheint dachziegelartig gefaltet.

Abb. 43 1 mg Fraktion 4, 15 Minuten Inkubationszeit
Detailansicht der Proliferationszone. Tegument (T) und darunter liegende Muskulatur erscheinen unbeschädigt.

Abb. 44a 1 mg Fraktion 4, 15 Minuten Inkubationszeit
Querschnitt durch den Scolexbereich. Das Tegument (T) erscheint an einigen Stellen aufgeschwemmt, die darunter liegende Muskulatur weist Vakuolen auf.

Abb. 44b 1 mg Fraktion 4, 15 Minuten Inkubationszeit
Querschnitt durch den Scolexbereich mit Sauggrube (SU). Das Tegument (T) und die inneren Strukturen des Cestoden sind völlig aufgelöst.

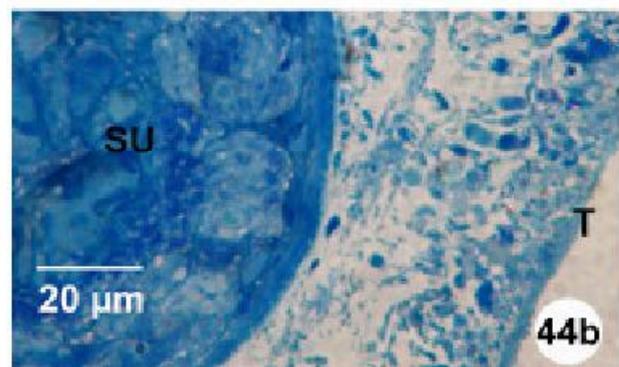
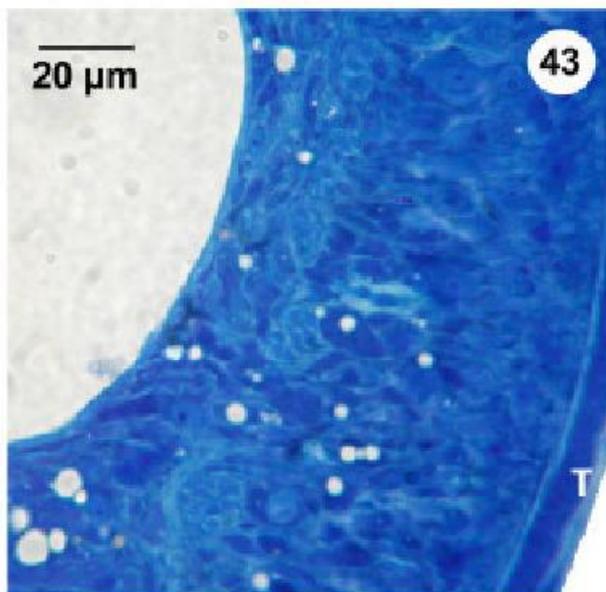
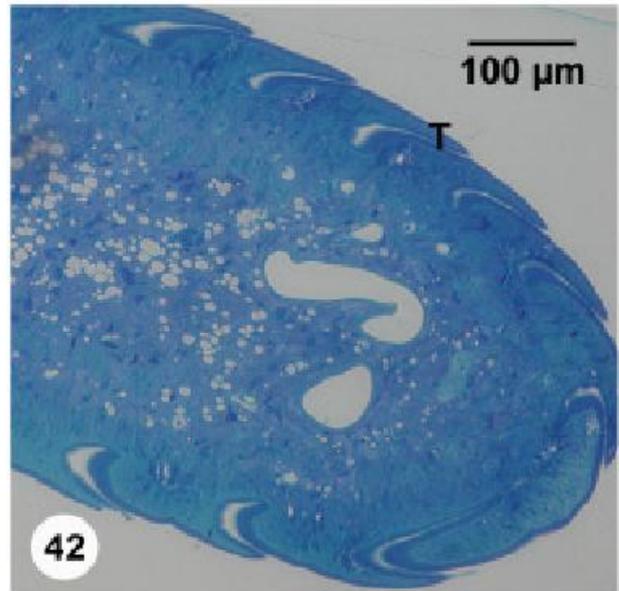
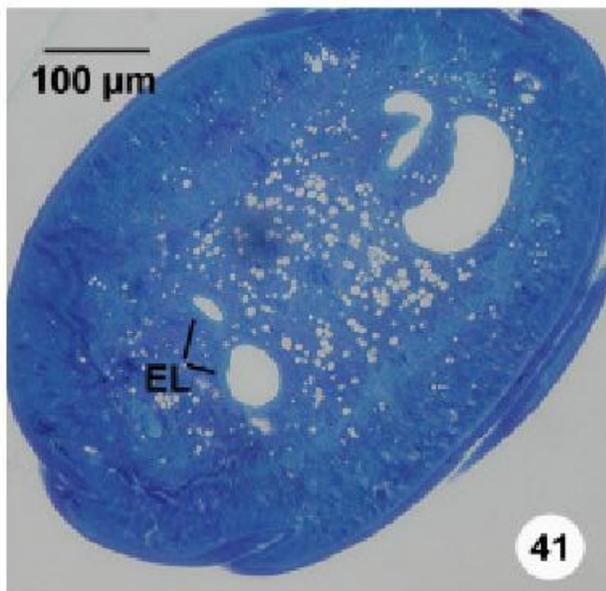
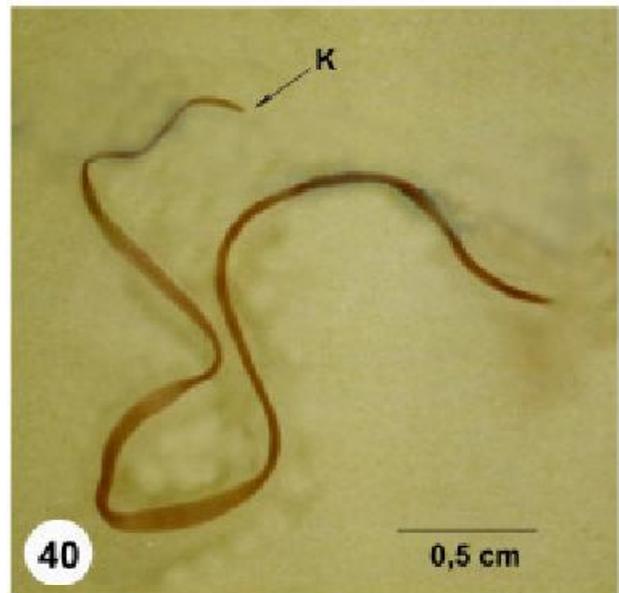


Abb. 45-49 **Lichtmikroskopische Aufnahmen verschiedener Parasitenspezies**

Abb. 45 *Toxocara cati*
Unbehandelte Adultnematoden in einer Petrischale.

Abb. 46a *Toxocara cati*
Unembryoniertes Ei aus dem Kot der Hauskatze.

Abb. 46b *Toxocara cati*
Infektiöses Ei mit Larve L1.

Abb. 47 *Toxocara cati*
Kopf mit typischen Alae eines adulten Nematoden

Abb. 48 *Fasciola hepatica*
Adulte Trematoden aus den Gallengängen.

Abb. 49 *Fasciola hepatica*
Gedeckeltes Ei (130-150 µm) aus dem Kot einer infizierten Wistar-Ratte

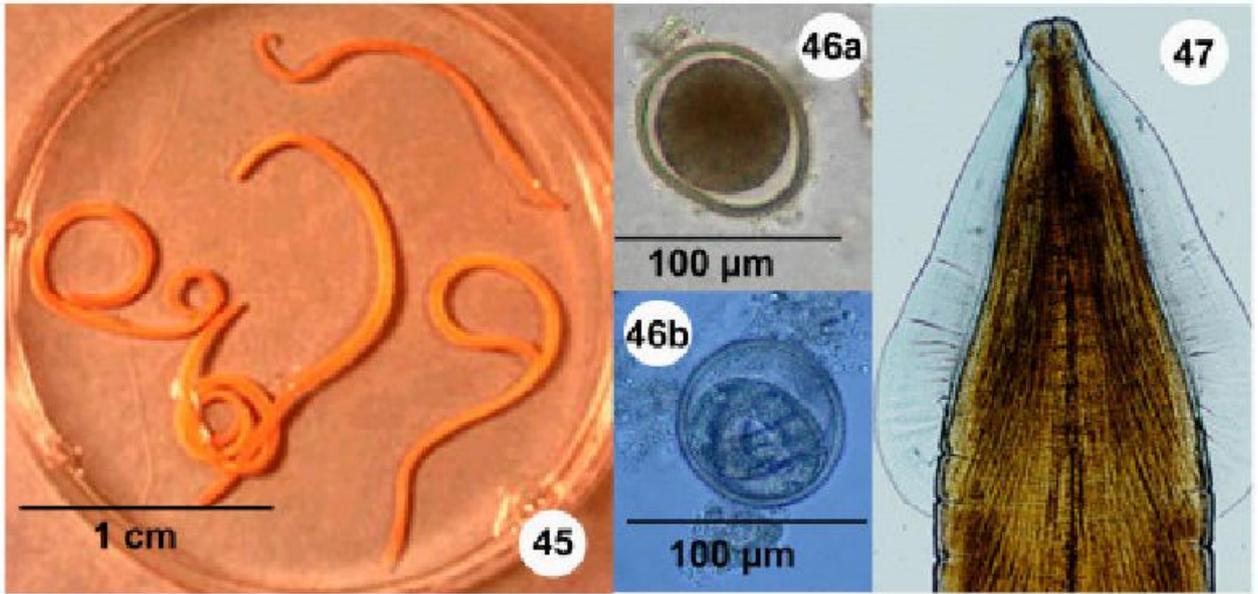


Abb. 50-53 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 50 Männchen, Kontrolle
Querschnitt durch Kutikula (K), Hypodermis (H) und die kontraktile (KM) bzw. zu den Nervensträngen ziehenden nichtkontraktile (NK) Bereiche der Muskulatur.
- Abb. 51 Männchen, Kontrolle
Die Muskelzellen mit den einzelnen Filamenten liegen dicht nebeneinander. Der nichtkontraktile Bereich (NK) enthält Strukturen, wie Zellkerne, Mitochondrien (MI) und Glykogenablagerungen.
- Abb. 52 Männchen, Kontrolle
Detailansicht des nichtkontraktile Bereichs der Muskulatur.
- Abb. 53 Männchen, 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch die Muskulatur. Hypodermis (H) und der Bereich neben der die Muskelzellen abgrenzenden Basallamina, weist zahlreiche Vakuolen auf (Pfeile). Die Kutikula (K) erscheint unbeschädigt.

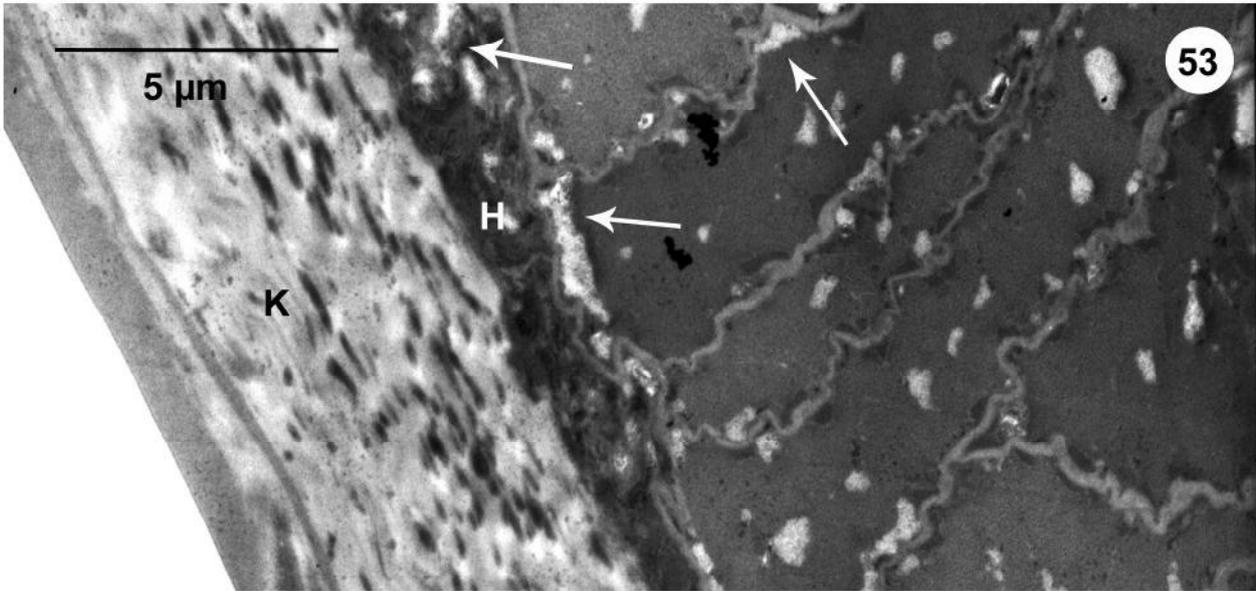
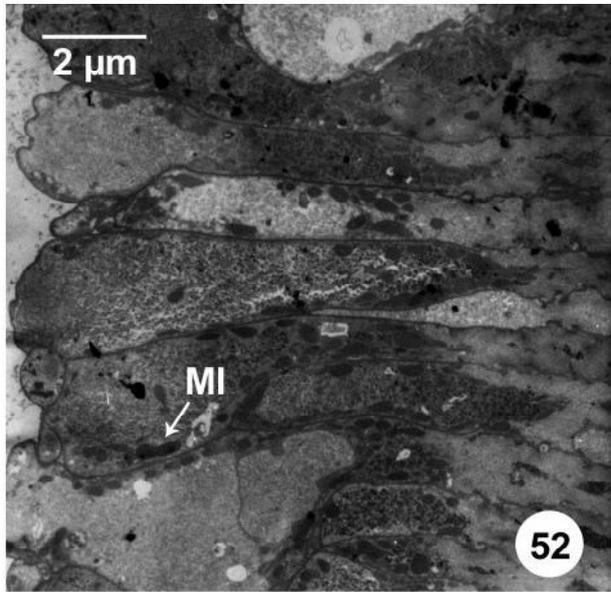
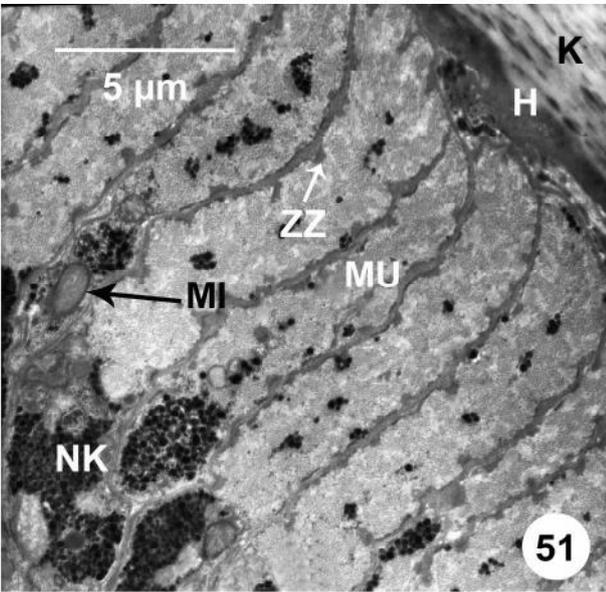
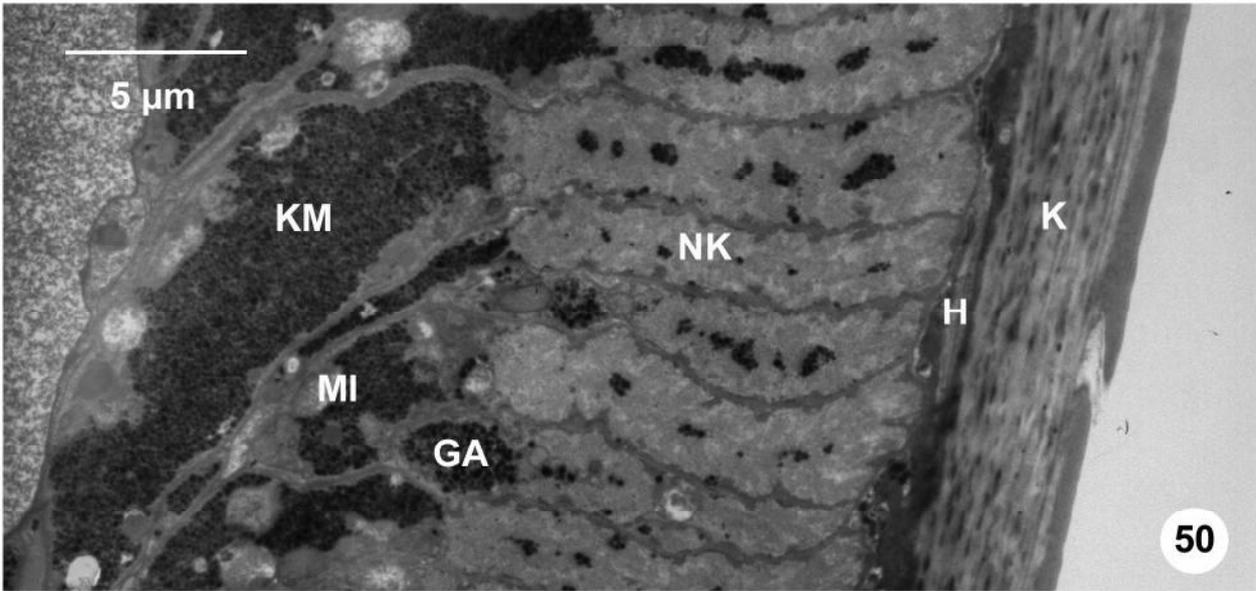


Abb. 54-56 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 54 Männchen , 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht der nichtkontraktilen Muskulatur (NK). Der intrazelluläre Raum zwischen den einzelnen Muskelzellen im kontraktilen, sowie im nichtkontraktilen Bereich ist aufgelöst. Die Basallamina (BL) hat sich aufgelöst. Die Mitochondrien der nichtkontraktilen Muskulatur (NK) erscheinen abgerundet und aufgelöst.
- Abb. 55 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Die Hypodermis (H) ist stark vakuolisiert. Die Basallamina (BL) zwischen den Muskelzellen (M) hat sich aufgelöst.
- Abb. 56 Männchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht der nichtkontraktilen Muskulatur (NK). Die Zellen sind stark geschädigt und die Strukturen, wie Mitochondrien (MI) und Zellkern zerstört.

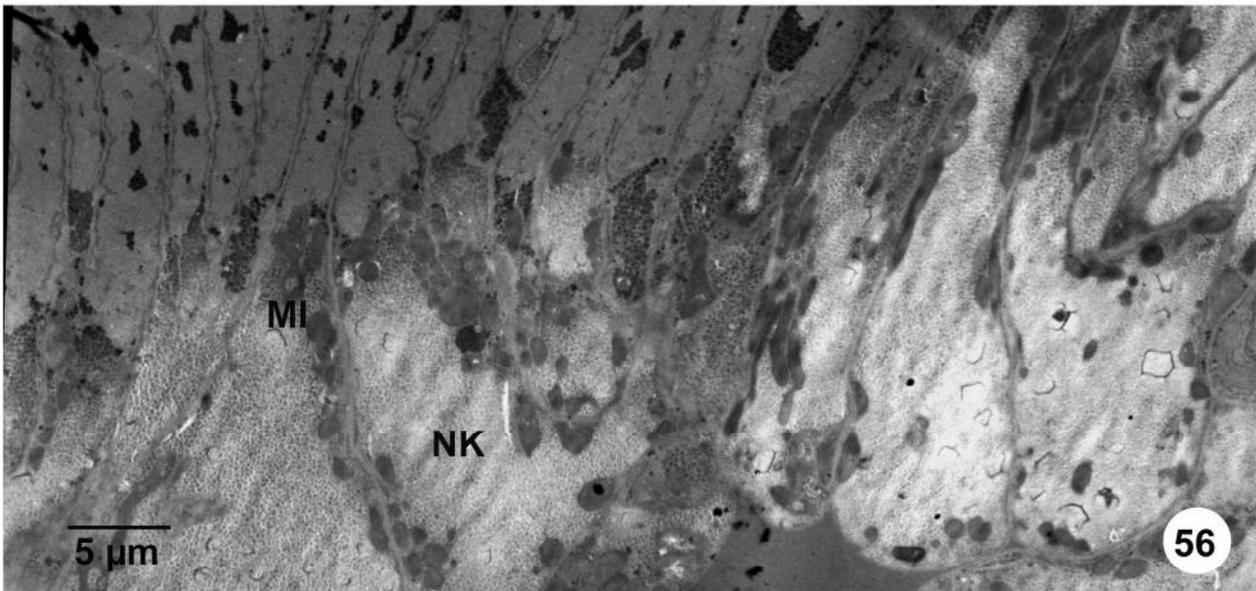
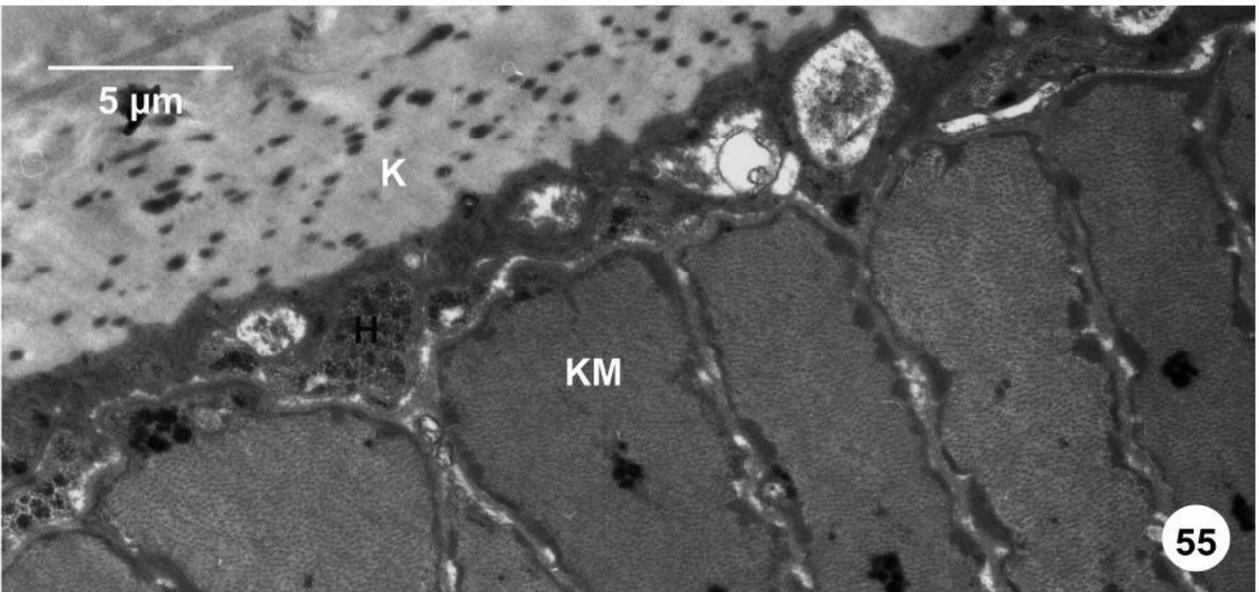
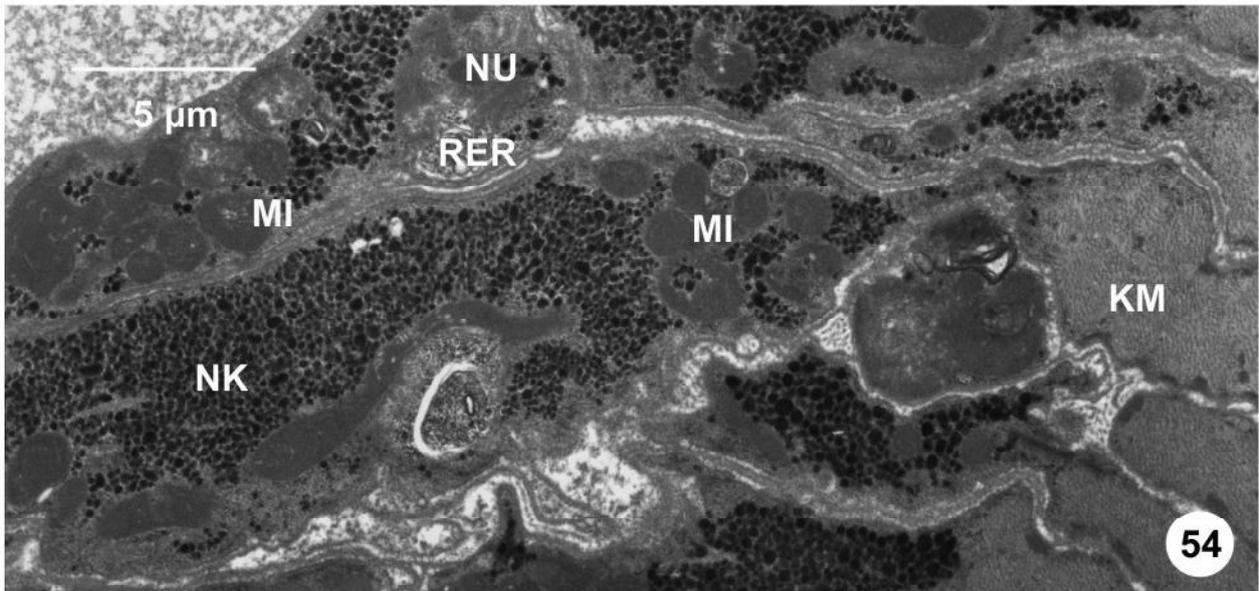


Abb. 57-60 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 57 Männchen, Kontrolle
Querschnitt durch die Nervenleiste. Die mit der Basallamina umgebenen Axone liegen im engen Zellverband an den Muskelzellen.
- Abb. 58 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch einen stark vergrößerten Nervenstrang. Die Nervenzellen (NZ) sind vakuolisiert. Deutlich sichtbar hat sich ein Spalt zwischen Hypodermisleiste und Muskulatur gebildet. Auch zwischen den Muskelzellen haben sich Freiräume gebildet.
- Abb. 59 Weibchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht eines geschädigten Hypodermisstrangs. Deutlich erkennbar sind die aufgelösten Strukturen der Basallamina (BL) und des intrazellulären Raums zwischen den einzelnen Muskelzellen.
- Abb. 60 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht eines stark massiv geschädigten Nervenstrangs. Die Axone sind stark geschädigt, die Basallamina und die intrazelluläre Matrix der Muskelzellen zerstört.

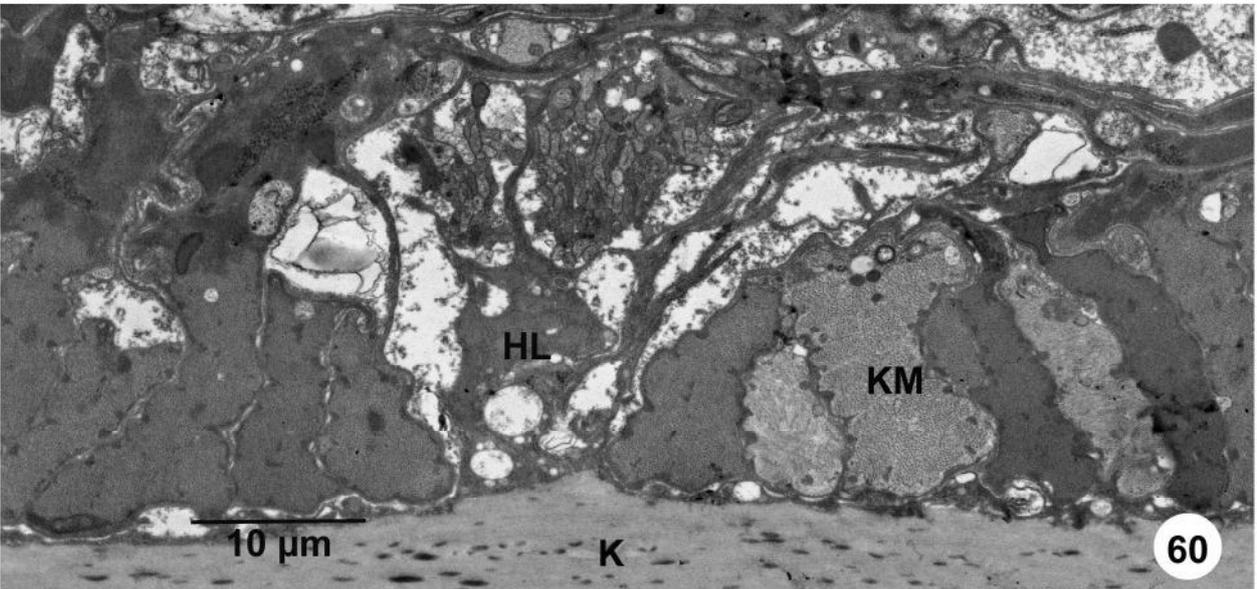
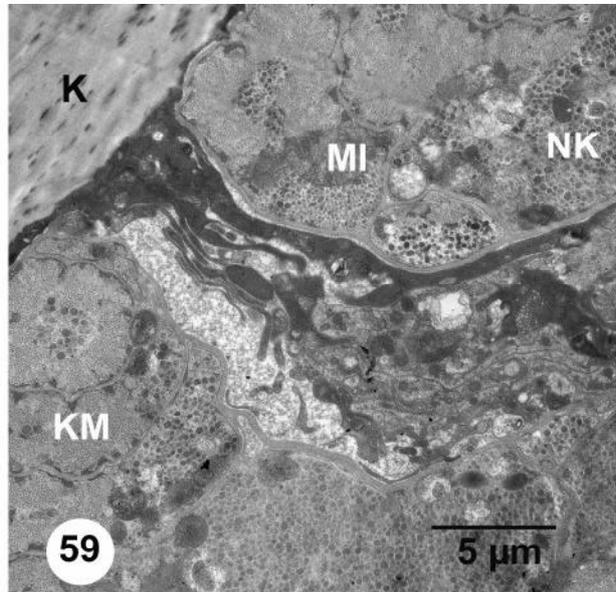
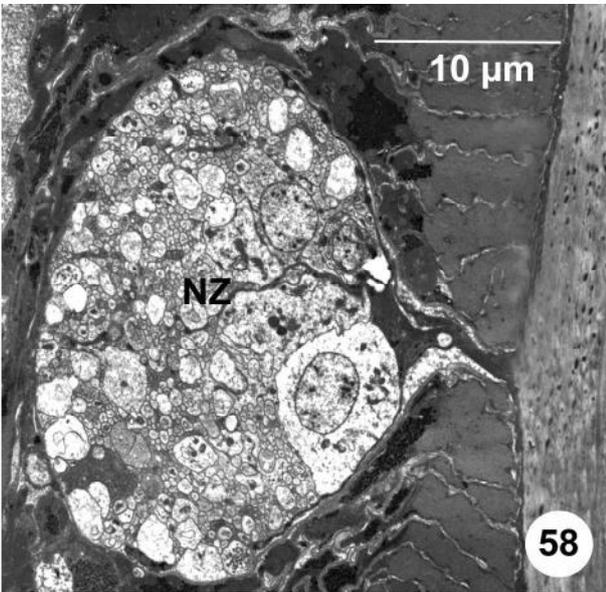
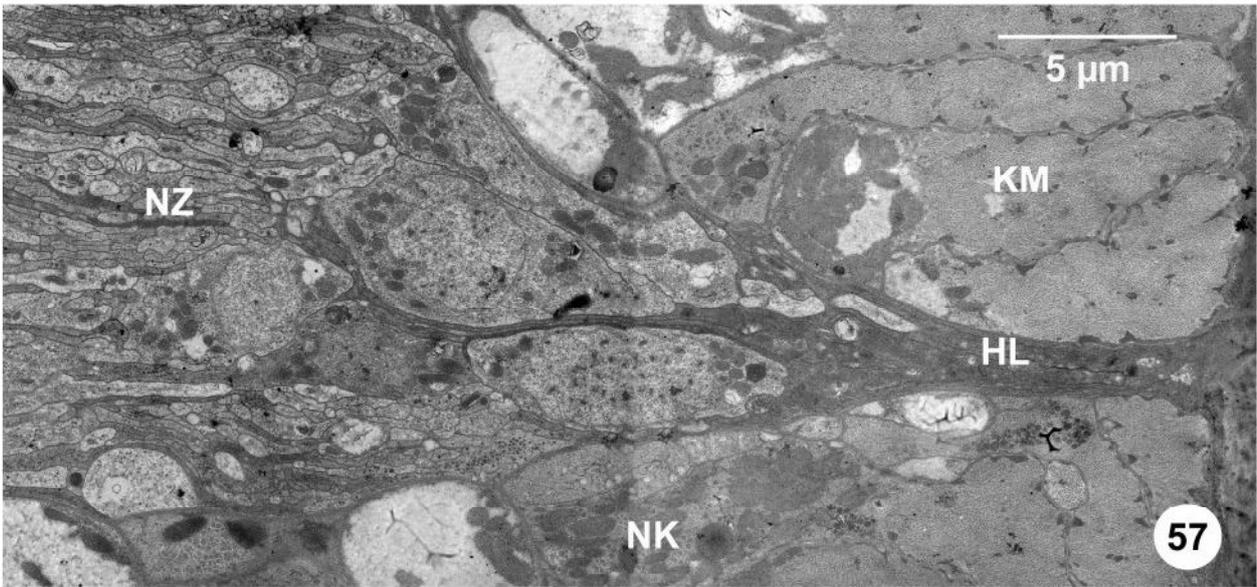


Abb. 61-65 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 61 Weibchen, Kontrolle
Detailansicht von Spermatiden (SD).
- Abb. 62 Männchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht von unbeschädigten Spermatiden (SD)
- Abb. 63 Männchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch die Samenblase. Das Epithel mit der Ringmuskulatur (RM) ist vakuolisiert, die Basallamina (BL) hat sich in ihre Einzelmembranen aufgelöst. Die reifen Spermien (S) erscheinen unverändert.
- Abb. 64 Männchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Hodenschlauch. Zwischen Spermatogonien (SG), Spermatiden (SD) und reifen den Spermien (S) haben sich deutlich sichtbar Vakuolen gebildet.
- Abb. 65 Männchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Hodenschlauch. Zwischen den unterschiedlichen Reifestadien der Spermien haben sich große Freiräume gebildet.

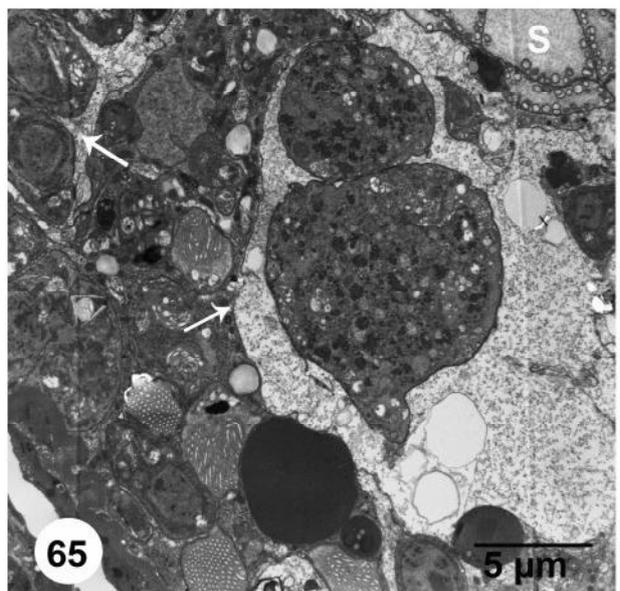
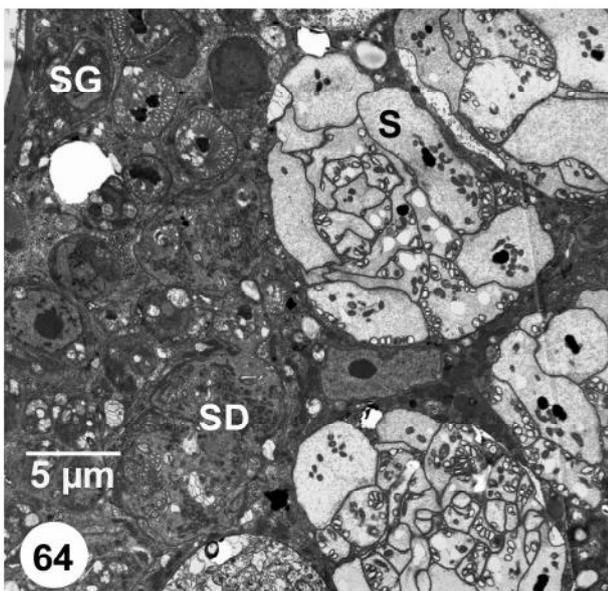
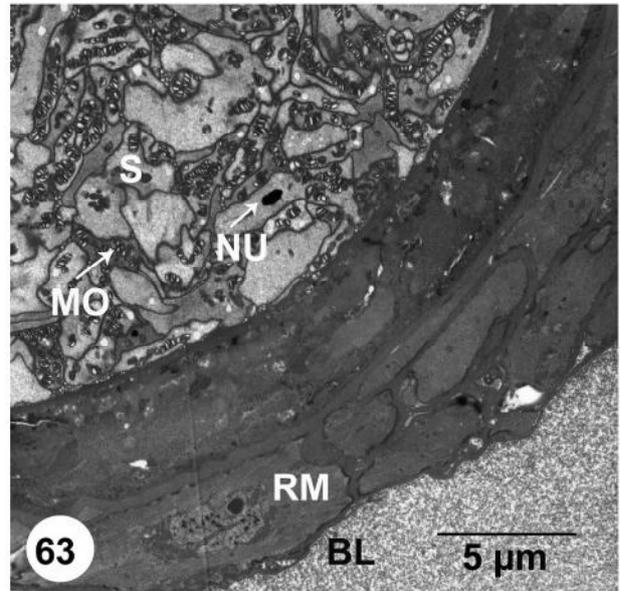
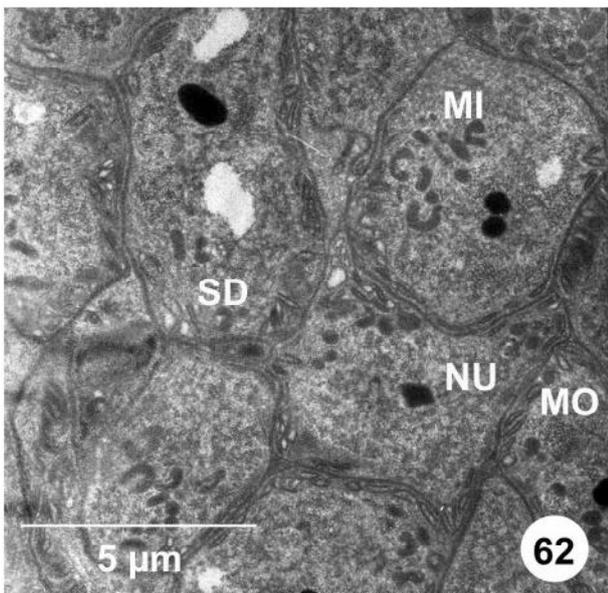
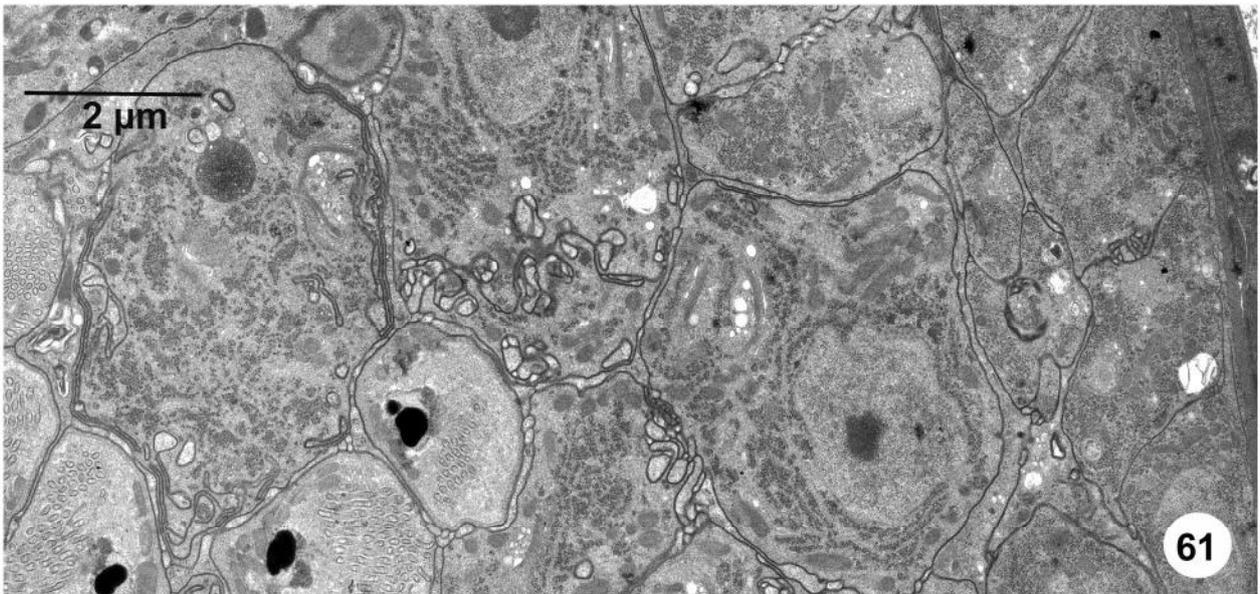


Abb. 66-70 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 66 Männchen, Kontrolle
Querschnitt durch das Darmepithel mit zum Lumen hin ausgebildeten Mikrovillisaum (MV).
- Abb. 67 Männchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Darmepithel (DE). Mikrovillisaum (MV) und Epithel erscheinen unverändert.
- Abb. 68 Männchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Darmepithel. Mikrovillisaum (MV) und Epithel erscheinen unverändert.
- Abb. 69 Weibchen, 2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Deutlich sichtbar ist eine starke Vakuolisierung des Darmepithels. Die Basallamina (BL) erscheint unverändert.
- Abb. 70 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Darmepithel. Zellstrukturen des Epithels sind massiv geschädigt. Die abgrenzende Basallamina (BL) erscheint unverändert.

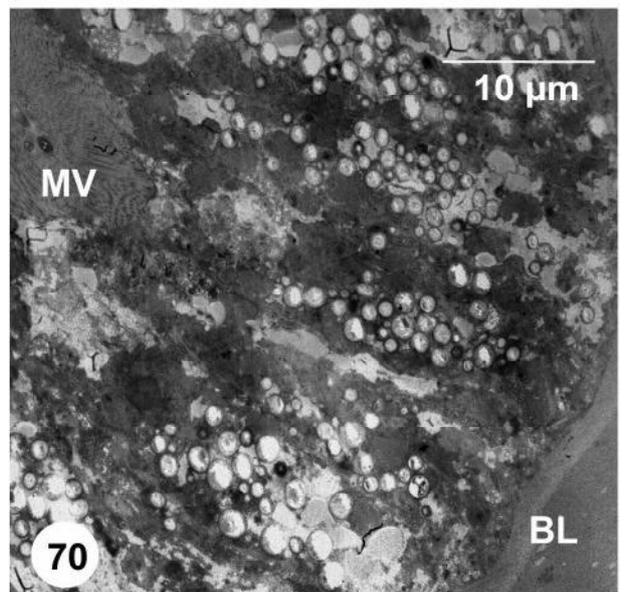
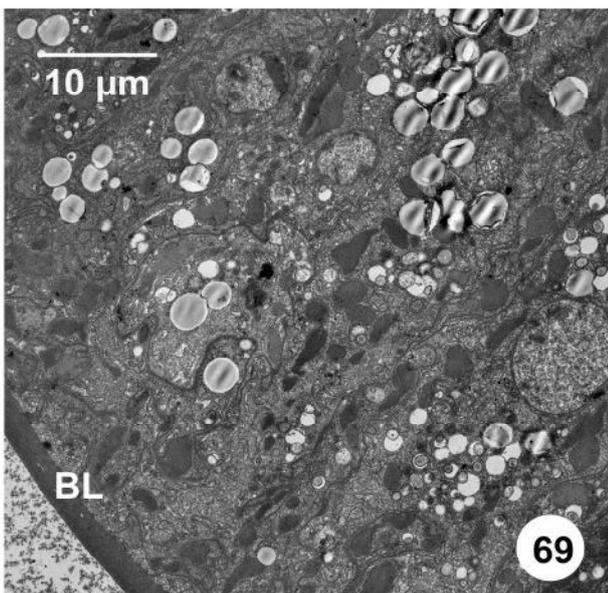
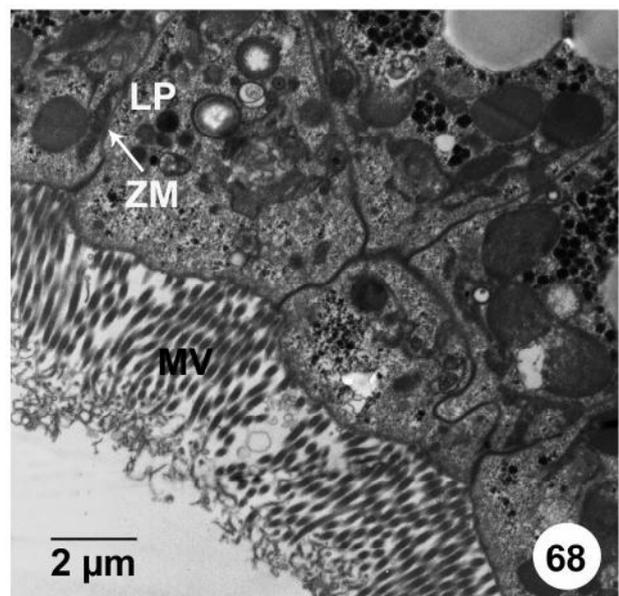
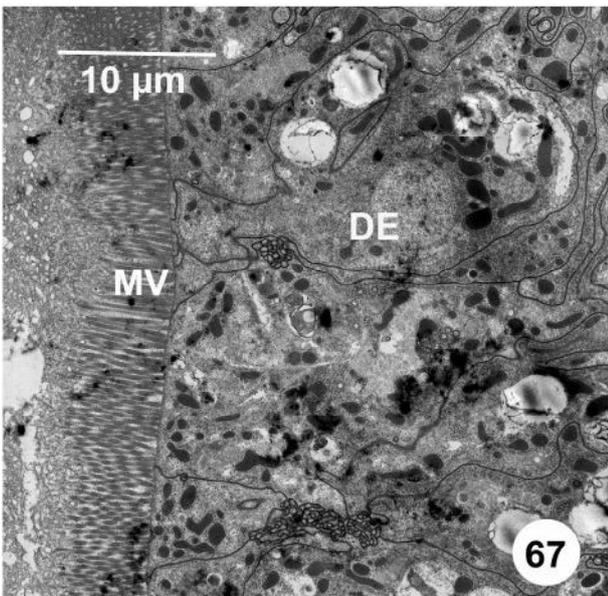
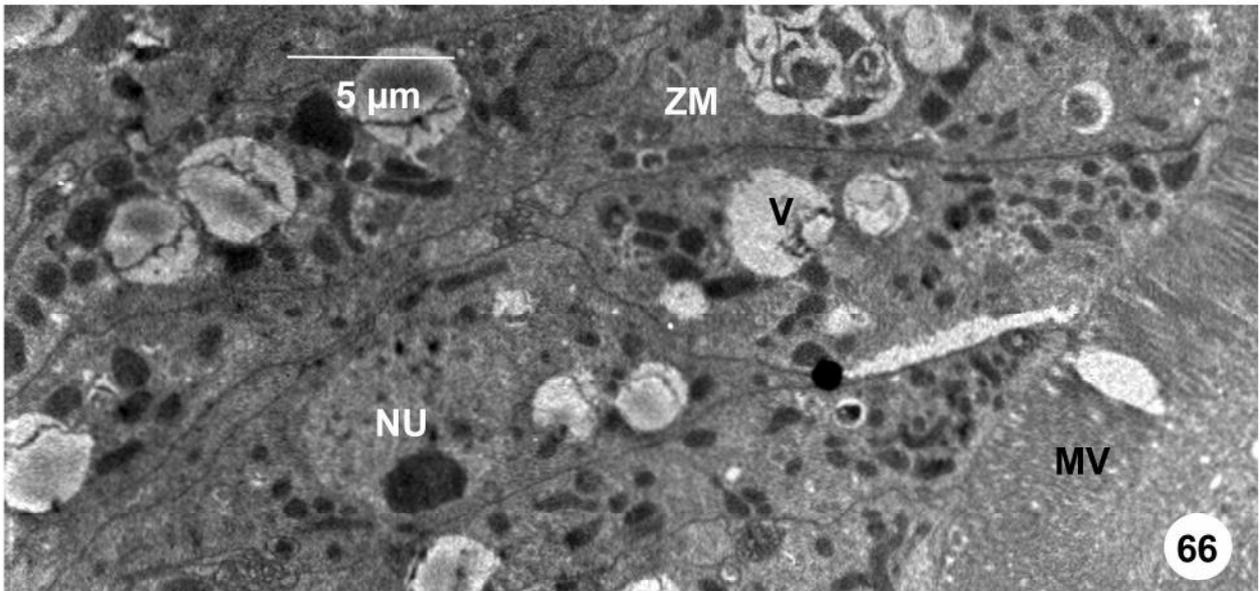


Abb. 71-76 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Trichuris muris***

- Abb. 71 Weibchen, Kontrolle
Querschnitt durch das Ovar. Die Oozyten (OZ) liegen dicht nebeneinander und sind durch eine eng anliegende Basallamina (BL) vom Pseudocoel abgetrennt. Auf der Oberfläche der Oozyten befinden sich Mikrotrichen.
- Abb. 72 Weibchen, 0,2 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Ovar. Die Oozyten (OZ) liegen auseinander, die abschließende Basallamina (BL) hat sich in ihre Einzelmembranen getrennt, oder ist teilweise ganz aufgerissen.
- Abb. 73 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht eines Eies. Die Vitellinschicht und darunter liegende Schichten erscheinen deformiert und haben sich abgelöst.
- Abb. 74 Weibchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch das Ovar. Zwischen den Oozyten (OZ) haben sich große Freiräume gebildet, in denen sich die intrazelluläre Matrix aufgelöst hat. Die Mikrotrichen haben sich von der Oozytenoberfläche abgelöst.
- Abb. 75 Weibchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Detailansicht der Basallamina des Ovars. Deutlich erkennbar sind die voneinander getrennten Einzelmembranen.
- Abb. 76 Weibchen, 4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Querschnitt durch den Uterus. Die Mitochondrien (MI) des Uterusepithels (UE) erscheinen abgerundet und aufgelöst. Die aufliegende Basallamina (BL), sowie die Uterusmuskulatur (UM) sind stark geschädigt.

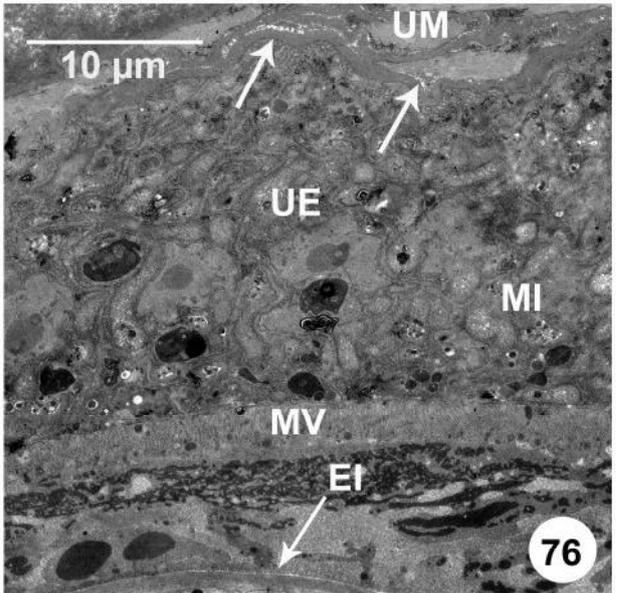
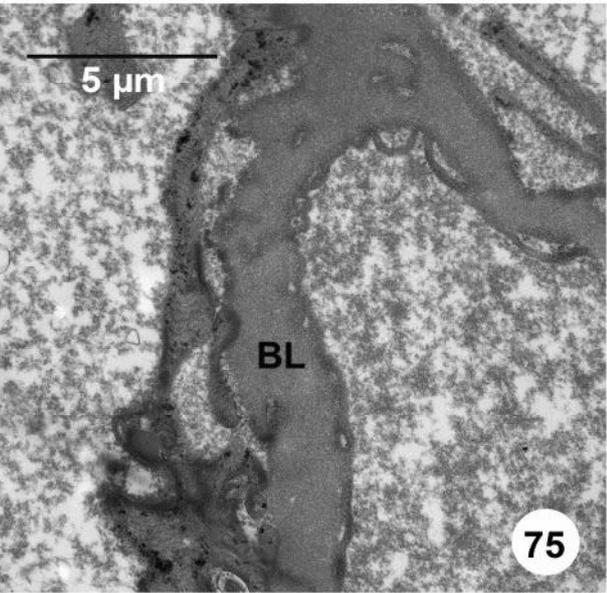
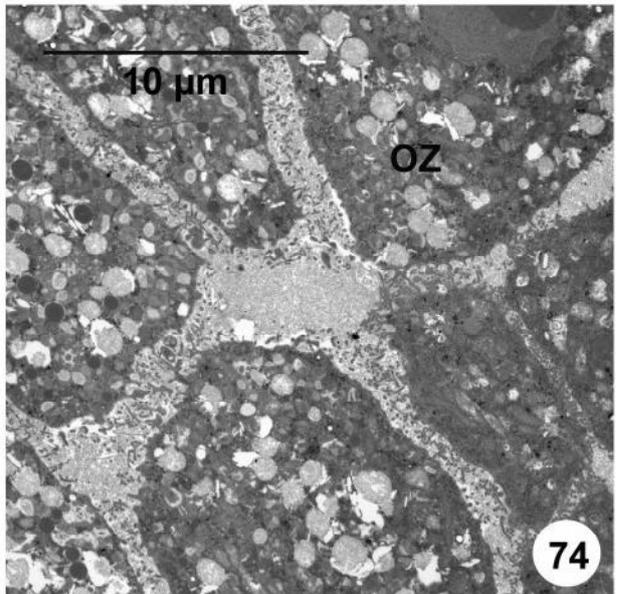
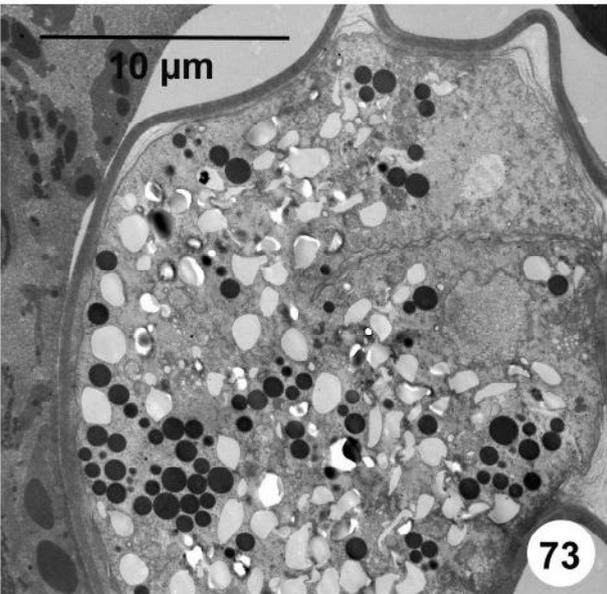
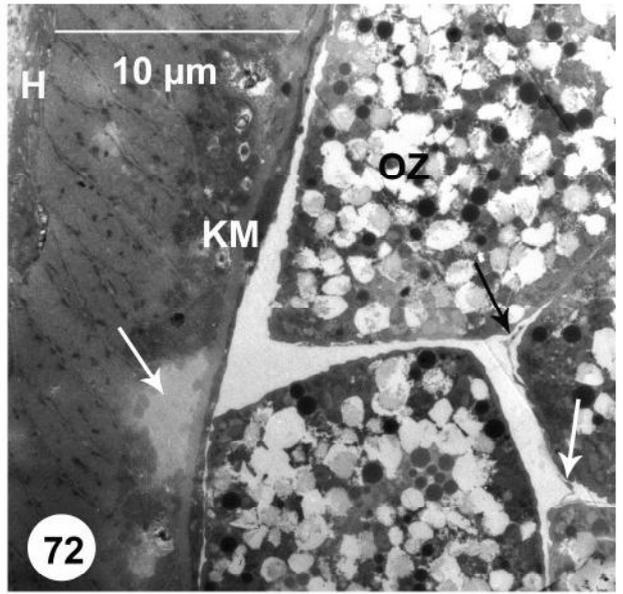
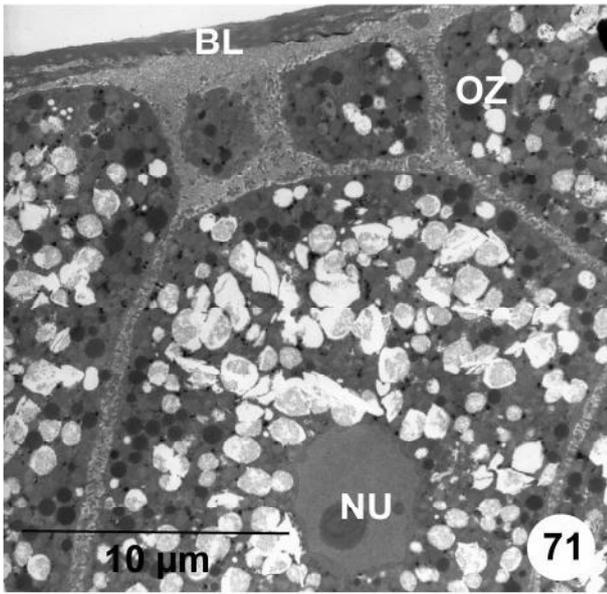


Abb. 77-80 **TEM-Aufnahmen der Ultradünnschnitte von *Hymenolepis microstoma***

- Abb. 77 *Hymenolepis microstoma*, Kontrolle
Querschnitt durch Tegument, Muskulatur und Parenchymzellen eines unbehandelten Cestoden.
- Abb. 78 *Hymenolepis microstoma*, Kontrolle
Detailansicht des Teguments mit aufliegenden Mikrotrichen (MT), Basallamina (BL) und Muskulatur (M).
- Abb. 79 *Hymenolepis microstoma*, 1 mg Fraktion 4, 15 Minuten Inkubationszeit
Querschnitt durch den Bereich der Sauggruben am Scolex. Das aufliegende Tegument ist vollständig zerstört. Die Muskulatur und die darunter liegenden Parenchymzellen erscheinen stark vakuolisiert. Eine Vakuolisierung der Saugmuskulatur (SM) lässt sich ebenfalls erkennen.
- Abb. 80 *Hymenolepis microstoma*, 1 mg Fraktion 4, 15 Minuten Inkubationszeit
Detailansicht des Teguments im Bereich der Sauggruben. Die Mitochondrien der syncytialen Schicht sind abgerundet und aufgelöst. Die aufliegenden Mikrotrichen sind vollständig verschwunden. Die ansonsten homogene Basallamina und die Ringmuskulatur sind erheblich vakuolisiert.

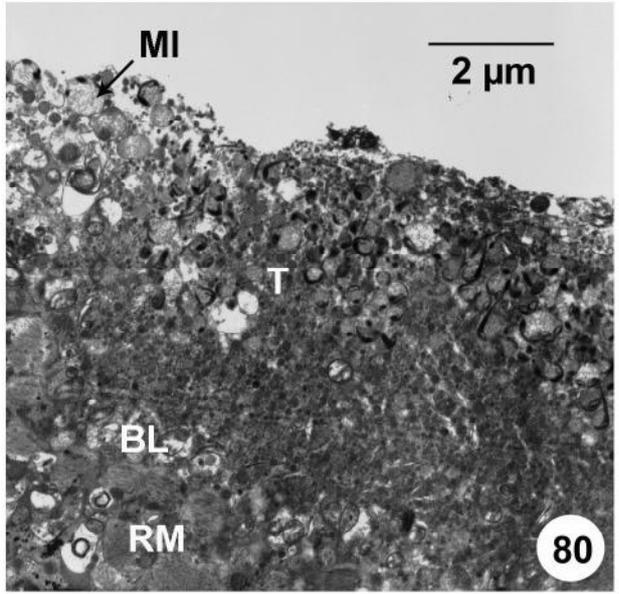
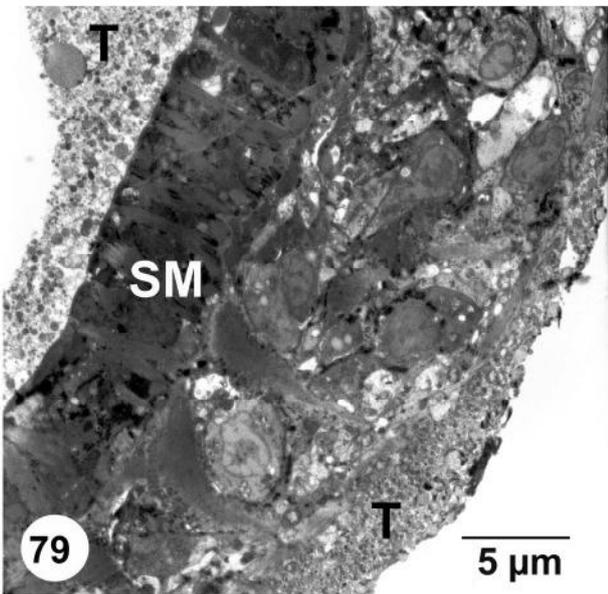
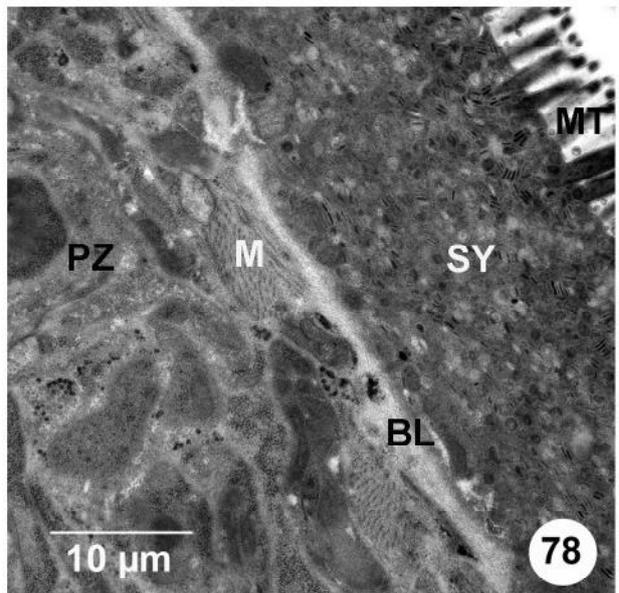
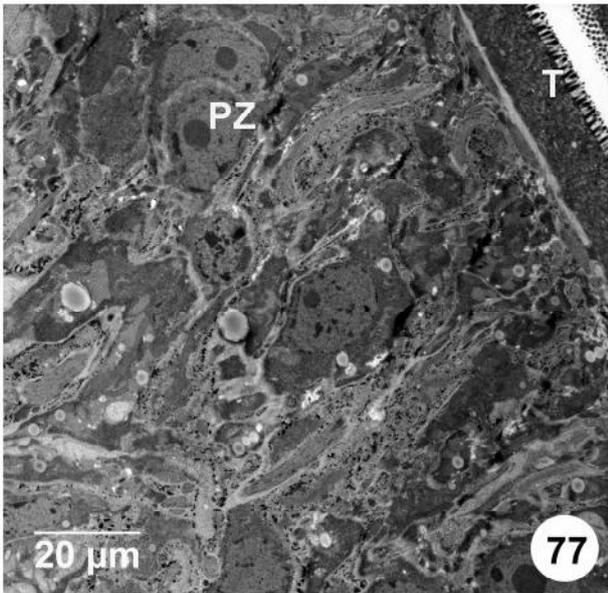


Abb. 81- 84 **Rasterelektronenmikroskopische-Aufnahmen der Totalpräparate von *Trichuris muris***

Abb. 81 Weibchen, Kontrolle
Dünnes Vorderende mit Mund (M) und auf der Oberfläche liegenden trichterförmigen Papillen (TP)

Abb. 82 Weibchen, Kontrolle
Kopf mit einem schwach ausgebildeten Mund.

Abb. 83 Weibchen, Kontrolle
Im vordern Drittel des Nematoden befinden sich die trichterförmigen Papillen.

Abb. 84 Weibchen, Kontrolle
Detailansicht einer trichterförmigen Papille mit einer Porenöffnung.

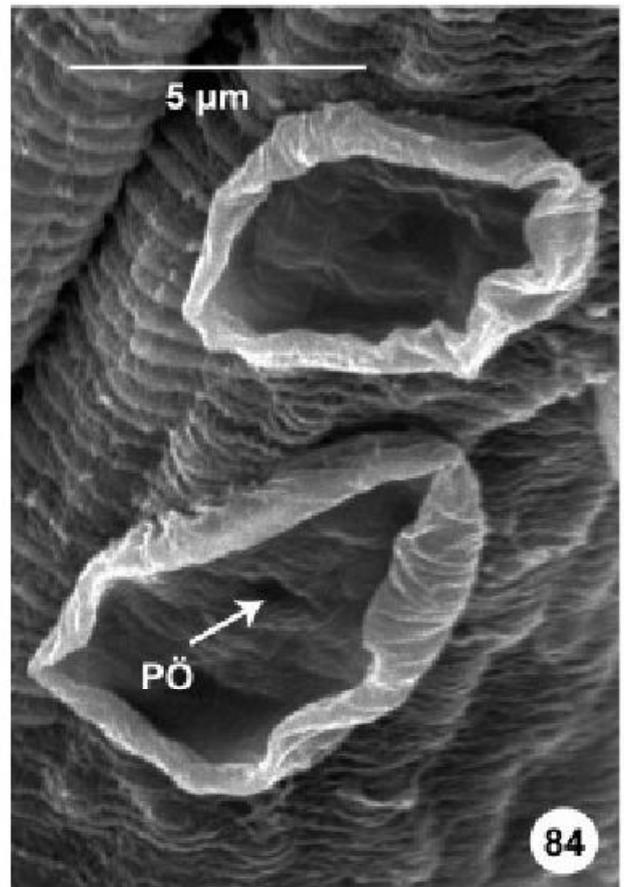
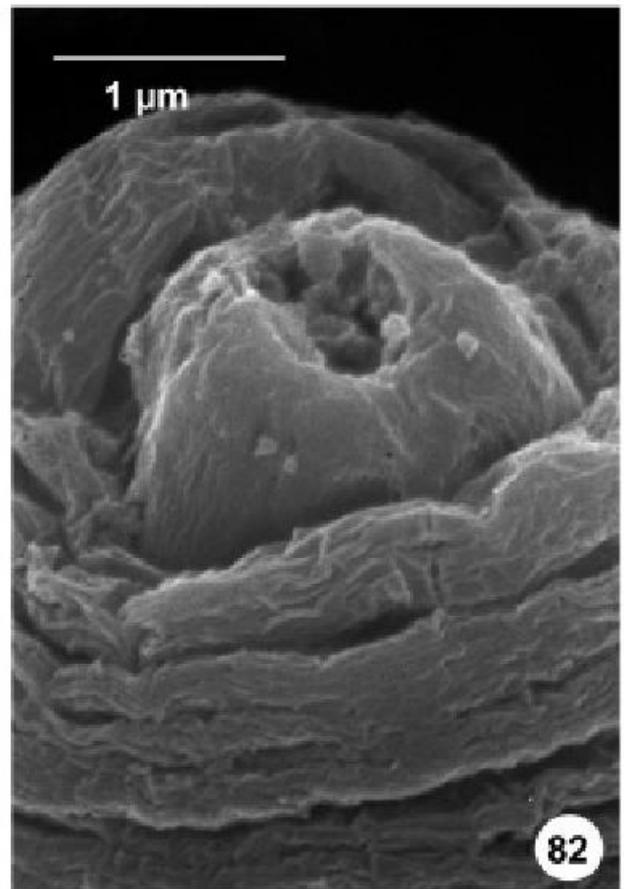
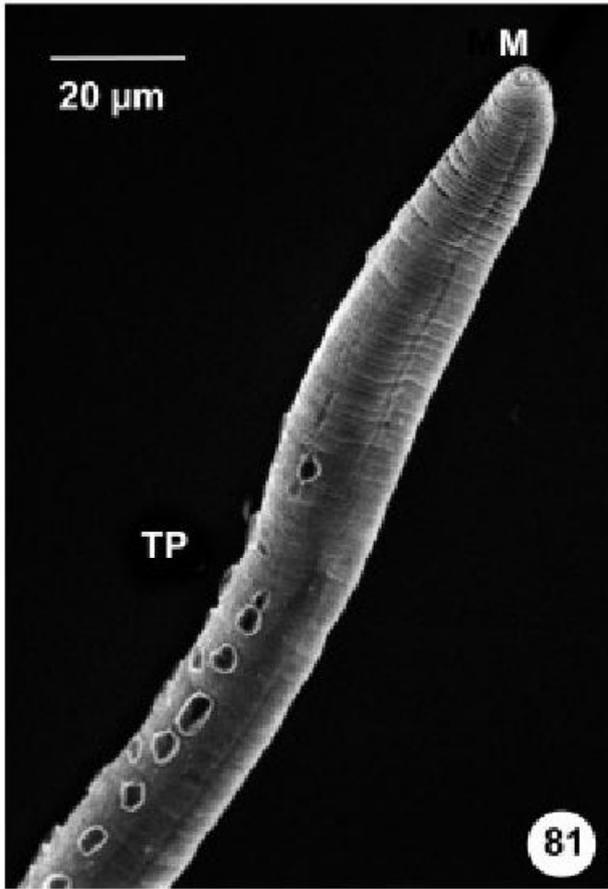


Abb. 85 -88 **Rasterelektronenmikroskopische-Aufnahmen der Totalpräparate von *Trichuris muris***

Abb. 85 Weibchen, Kontrolle
Detailansicht der Vulva (VU).

Abb. 86 Weibchen, Kontrolle
Detailansicht des am Hinterende liegenden Anus (AN).

Abb. 87 Männchen, Kontrolle
Detailansicht des männlichen Geschlechtssystems. Die Spikulumscheide ist mit einem dichten Hakenkranz (HK) besetzt.

Abb. 88 Männchen, 0,4 g CHLO_1/kg KGW Gerbil
Deutlich sichtbar ist die Verkrampfung des gesamten Nematoden, wodurch das Spiculum (SP) ausgestülpt ist.

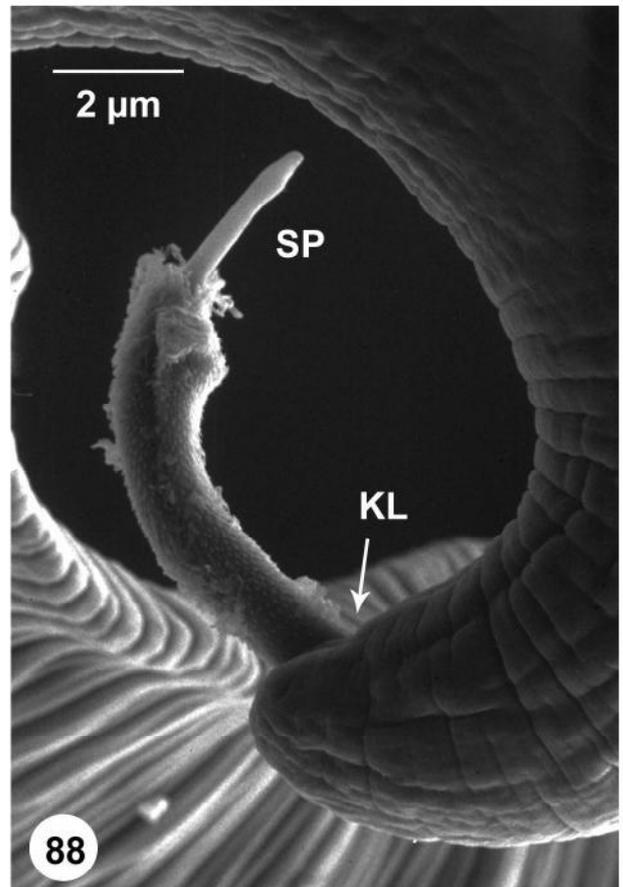
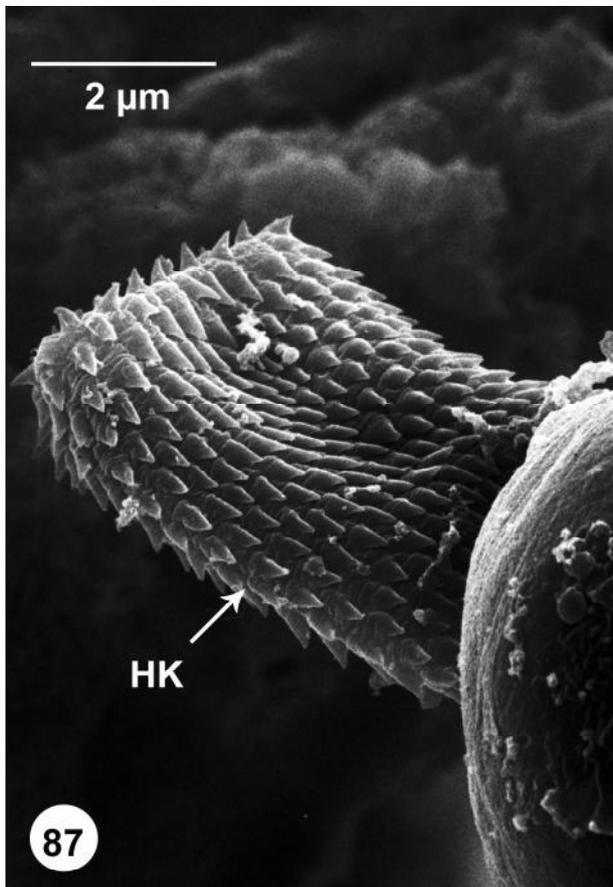
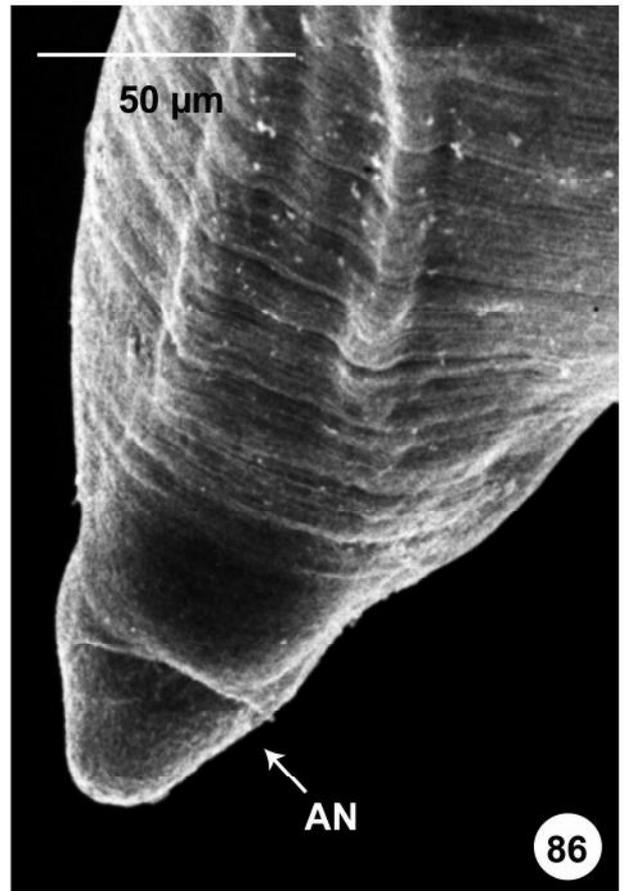
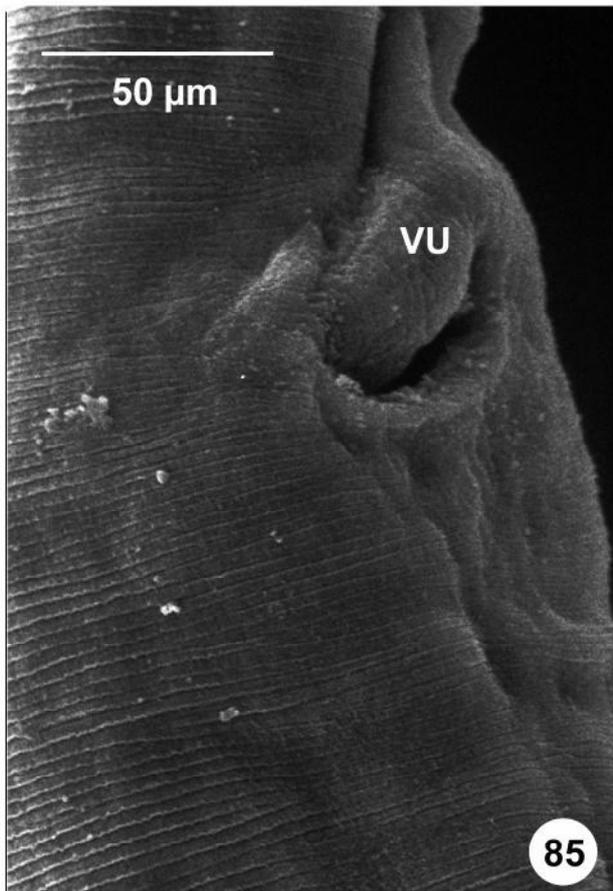


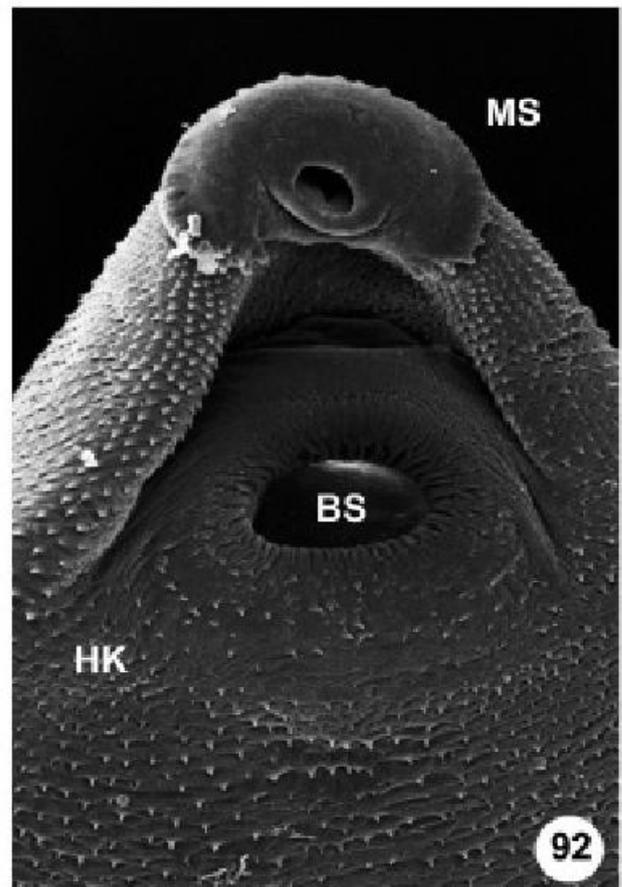
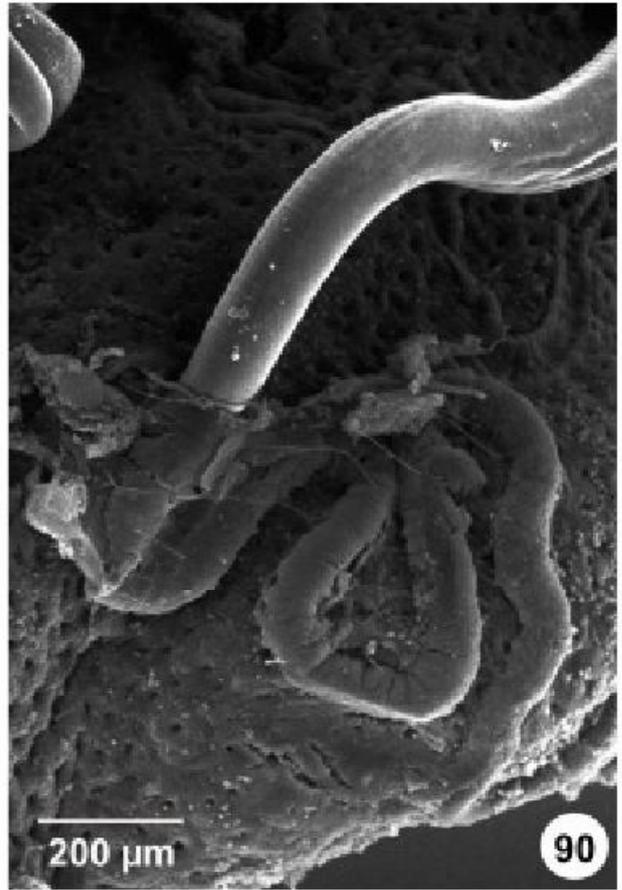
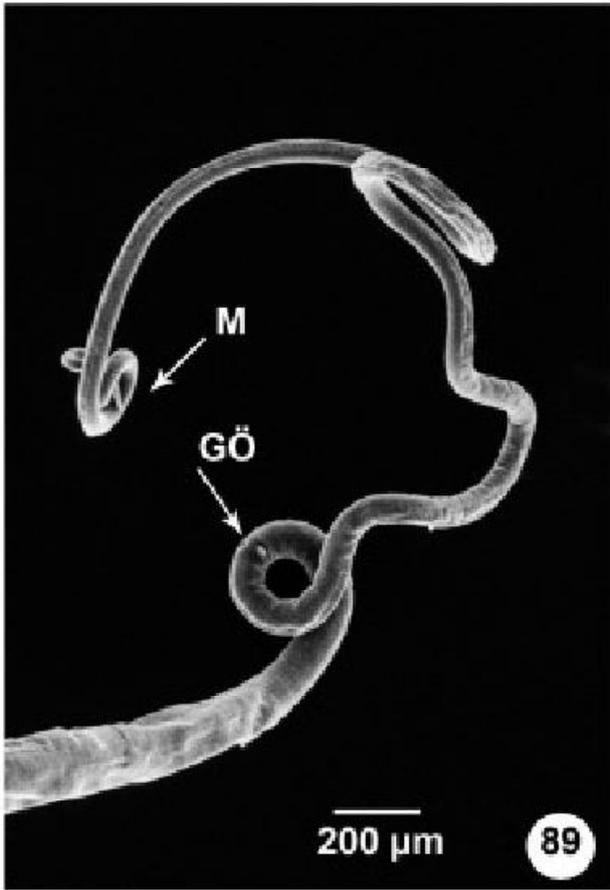
Abb. 89 - 92 Rasterelektonenmikroskopische-Aufnahmen von Totalpräparaten

Abb. 89 Weibchen, Kontrolle
Gesamtansicht des Vorderteils mit Geschlechtsöffnung (GÖ).

Abb. 90 Darmgewebe, Kontrolle
Der Nematode hat sich bis auf das hintere Drittel seines Körpers tunnelartig in das Darmepithel des Wirtstieres eingegraben.

Abb. 91 Scolex von *Hymenolepis microstoma*. mit vier Sauggruben und Rhostrum (RH). An den Scolex grenzt die Sprossungszone (SZ). x 60

Abb. 92 Aufnahme von *Echinostoma caproni* mit Haken-bewehrten Mundsaugnapf und Bauchsaugnapf. Die gesamte Trematodenoberfläche ist mit feinen Häkchen (HK) besetzt. x 30



Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für die Vergabe des Themas, die gute Betreuung und die Möglichkeit, in seinem Institut promovieren zu können.

Herrn Prof. Dr. H. Greven danke ich für die schnelle Übernahme des Zweitgutachtens

Herrn PD Dr. Günter Schmahl und Herrn Dr. Jürgen Schmidt danke ich für ihre hilfreichen Anregungen und Ratschläge.

Der technischen Assistentin Frau Marion Nissen danke ich für ihre kompetente Hilfe bei der Herstellung der elektronenmikroskopischen Abbildungen.

Herrn Steffen Köhler danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Photographien.

Herrn Dr. Oliver Kayser danke ich für die NMR-spektroskopische Analyse der Extrakte.

Frau Dr. RuAngelie Etrada-Ebel danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Strukturaufklärung und für die hilfreichen Anregungen und Hinweise.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und meinem Lebensgefährten Alexander Clees, die mir stets unterstützend zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt Thomas und Nahir Bachmaier, die mir durch ihre ethnobotanischen Kenntnisse die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

Ein spezieller Dank gilt meinem Sohn Julius Alexander, der mir auch in anstrengenden Zeiten stets ein Lächeln auf die Lippen gezaubert hat.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation - abgesehen von der Beratung meiner akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Diese Arbeit wurde weder ganz noch zum Teil einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Bianca Straßen
Ratingen, den