

**5.      Diskussion**

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob und in welcher Dosierung Albendazolsulfoxid auf den großen Leberegel *Fasciola hepatica* wirkt und inwiefern sich die möglichen Schäden im morphologischen Bilde nachweisen lassen. Es wurde zudem untersucht, ob durch den Einsatz eines Enhancers die Wirkstoffkonzentration verringert werden kann. Diese Untersuchungen erfolgten im Tierexperiment. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden die verschiedenen Applikationswege oral, intraperitoneal, subkutan und pour- on berücksichtigt und verglichen. Es wurden dazu Ratten oral mittels Schlundsonde mit Metazerkarien infiziert. Bei den verwendeten Schafen lag eine natürliche Infektion vor. Der Behandlungserfolg wurde durch Kotuntersuchungen und anschließender Sektion der Modelltiere (Ratten) überprüft.

Durch die elektronenmikroskopischen Betrachtungen des Parasiten sollte untersucht werden, welche morphologischen Veränderungen bei den behandelten Würmern auftreten. Es wurden dabei sowohl rasterelektronenmikroskopische als auch transmissionselektronenmikroskopische Analysen durchgeführt. Die zu untersuchenden Parasiten, wurden dazu zum einen nur mit Albendazolsulfoxid und zum anderen mit Albendazolsulfoxid in Kombination mit einem Enhancer behandelt. Der Trematode *F. hepatica* ist seit seiner ersten Beschreibung und Benennung durch LINNE (1758) von verschiedenen Forschergruppen im Hinblick auf seine Morphologie untersucht worden (THREADGOLD, 1978; HANNA, 1976; BENNET, 1975; LUMSDEN, 1975). Auch unterschiedliche Bekämpfungsmaßnahmen waren Inhalt vieler Untersuchungen (CRAIG und HUEY, 1984; MC KELLAR und KINBO, 1991; SPENCE et al., 1992). In einigen neueren Untersuchungen wurde die Wirksamkeit der eingesetzten Wirkstoffe mit elektronenmikroskopischen Verfahren überprüft (BECKER et al., 1980; SKUCE und FAIRWEATHER, 1989; STITT und FAIRWEATHER, 1991, 1993 (a et b), 1994; MEANEY et al., 2004). Auch zu dem in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoff wurden bereits elektronenmikroskopische Untersuchungen an *in vitro* behandelten *F. hepatica* durchgeführt (BUCHANAN et al., 2002).

### 5.1 Diskussion der tierexperimentellen Befunde

Im tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurde die Dosierung von Albendazolsulfoxid bei alleiniger Applikation und in Kombination mit dem Enhancer ermittelt. Dabei wurde das Medikament oral, pour-on, intraperitoneal oder subkutan den mit *F. hepatica* infizierten Versuchstieren (Ratten und Schafe) verabreicht.

Sowohl der Infektionserfolg, als auch der Behandlungserfolg, wurden zunächst anhand von Kotuntersuchungen kontrolliert. Es wurde sieben Tage vor der Behandlung und sieben Tage nach der Behandlung der Kot der Versuchstiere täglich mittels der Sedimentationsmethode nach LYNNE und LAWANCE (1979) auf Wurmeier überprüft. Im Kot sind in der Patenz, wenn die adulten Leberegel in den Gallengängen parasitieren, die Eier von *F. hepatica* mit der Sedimentationsmethode nachweisbar (BRAUN et al., 1995; HASSLINGER, 1999; SCHNIEDER, 2000). In den meisten epidemiologischen Studien über die Fasciolose, wurde die Sedimentationsmethode eingesetzt (DWINGER et al., 1982; BOULARD et al., 1985; BOUVRY und RAU, 1986; AKHTER et al., 2001). Auch in vergleichenden Untersuchungen mit Albendazol und Albendazolsulfoxid wurde der Infektionserfolg der oral mit Metazerkarien infizierten Tiere mittels der Sedimentationsmethode überprüft (SOLANA et al., 2000). Serologische Nachweisverfahren haben eine geringere Sensitivität als der koproskopische Nachweis der Leberegeleier mit Hilfe der Sedimentationsmethode (KAPLAN, 1994).

Die Infektion der Ratten mit Metazerkarien und die orale Behandlung erfolgten mittels einer Schlundsonde. Zur Infektion der Ratten dienten jeweils 14 Metazerkarien. In anderen Untersuchungen mit experimentell infizierten Ratten wurden die Versuchstiere mit 20 Metazerkarien (CHARBON et al., 1991; VALERO et al., 2000; MEANEY et al., 2003), 25 Metazerkarien (BORAY, 1985) bzw. 35 Metazerkarien (SCHUSTER und LÄMMLER, 1973) oral infiziert.

Aus den durchgeführten Versuchsreihen ergab sich, dass die oral, subkutan bzw. intraperitoneal mit Albendazolsulfoxid behandelten Tieren bei einer Dosis von 30 mg pro kg Körpergewicht keine Eier mehr ausschieden. Bei gleichzeitiger Behandlung mit dem Enhancer schieden die Tiere bereits bei einer Dosis von 20 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht keine Eier mehr aus.

Bei den pour- on behandelten Tieren wurde der Wirkstoff im Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) (JACOB, 1963) gelöst. DMSO ist ein Lösungsmittel aus der Chemie und Pharmakologie. Im letzteren Bereich dient es außerdem als Trägerstoff für bestimmte Arzneimittel bei äußerlicher Anwendung (Salbe, Creme). Durch die Zugabe von DMSO können andere Arzneimittel leichter die Barriere der Haut durchdringen und somit besser wirken.

Das Lösungsmittel DMSO selbst wirkt nicht fasziolid (STITT et al., 1995). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben keinen Anhaltspunkt, dass DMSO, hier als Trägerstoff eingesetzt, die Wirksamkeit der Testsubstanz Albendazolsulfoxid beeinträchtigte.

Die pour- on behandelten Tiere schieden nach einer Behandlung mit 130 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht keine Eier mehr aus. Bei Tieren, die zusätzlich mit Enhancer behandelt wurden, zeigten sich bei einer Dosierung von 90 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht keine Eier mehr im Kot.

Es wurde festgestellt, dass Albendazolsulfoxid in den untersuchten Wirkstoffmengen bei juvenilen Stadien von *F. hepatica* keine Wirkung hatte. Die mit 14 Metazerkarien infizierten Ratten wurden fünf Wochen nach der Infektion mit den für die adulten Würmer wirksamen Wirkstoffmengen behandelt. Die nach 35 Tagen durchgeführten Kotuntersuchungen ergaben, dass die behandelten Versuchstiere trotz der Behandlung mit der Eiausscheidung begannen.

Es hatte sich schon in früheren Untersuchungen erwiesen, dass Albendazol bzw. Albendazolsulfoxid, auch in hohen Dosen nicht gegen die juvenilen Stadien von *F. hepatica* wirkt (KNIGHT und DICKESON, 1977; JOHNS und DICKESON, 1979; VAN SCHALKWYK et al., 1979; THEODORIDES und FREEMAN, 1980; MALONE et al., 1982).

Im Anschluss an die mit Ratten durchgeführten Versuche, wurden vergleichbare Analysen bei Schafen durchgeführt. Bei den verwendeten Schafe lag eine natürliche Infektion mit *F. hepatica* vor. Bei den von MEANEY et al. (2003) durchgeführten Versuchen erfolgten die Untersuchungen ebenfalls an natürlich mit *F. hepatica* infizierten Schafen.

Für die orale Behandlung, bestätigte sich die bei den Rattenversuchen ermittelte Dosierung auch für die Schafe. Die mit 20 mg Albendazolsulfoxid und Enhancer behandelten Schafe schieden ab dem zweiten Tag nach der Behandlung keine Eier mehr aus.

Zudem ergab sich, dass bei der pour-on Behandlung die Dosierung für Schafbehandlung deutlich höher liegt als die für die Ratten ermittelte Dosis. Das mit 200 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht in Kombination mit Enhancer behandelte Schaf, schied ab dem zweiten Tag nach der Applikation keine Eier mehr aus.

Die in der Literatur für die Ausgangssubstanz Albendazol angegebenen Dosierungen zur Behandlung von *F. hepatica* liegen bei 10 mg (MARRINER und BORGAN, 1980; FREY und LÖSCHER, 1996) und 15 mg Albendazol pro kg Körpergewicht (BORAY und FAIRWEATHER, 1999). Untersuchungen ergaben, dass Albendazol in einer Dosierung von 10 mg pro kg Körpergewicht nur eine unvollständige Wirkung gegen erwachsene Leberegel hat (BORAY und FAIRWEATHER, 1999). In den von KILGORE et al. (1985) und CRAIG et al. (1992) durchgeführten Untersuchungen ergab sich eine Wirksamkeit von 91,4 % bei einer Wirkstoffmenge von 10 mg Albendazol pro kg Körpergewicht. Die von DORCHIES et al. (1992) durchgeführten Untersuchungen ergaben eine Wirksamkeit von 85 % bei derselben Dosierung, während Untersuchungen von KAPLAN (1994) eine Wirksamkeit von 76 bis 92 % bei einer Behandlung mit 10mg pro kg Körpergewicht erbrachten.

Für die wirksame Behandlung von *F. hepatica* mit Albendazolsulfoxid wird in der Literatur eine Wirkstoffmenge von 20 mg pro kg Körpergewicht angegeben (FETTERER et al., 1982). Nach den *in vitro* Untersuchungen von BUCHANAN et al. (2002) wird ebenfalls eine Dosierung von 20 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht als therapeutisch wirksame Dosis angegeben.

Die in dieser Arbeit ermittelte Dosierung für die orale Applikation von Albendazolsulfoxid zur Behandlung von adulten Leberegeln ist doppelt so hoch wie die laut Literatur angegebene Dosierung von Albendazol. Eine Ursache dafür, dass bei der Behandlung mit Albendazolsulfoxid eine höhere Wirkstoffdosis nötig ist, könnte die stärkere Hydrophilie des Stoffes sein. Die Bindung von Albendazol an das Tubulin des Parasiten ist effektiver als die seines aktiven Sulfoxidmetaboliten (LACEY et al., 1987; LUBEGA und PRICHARD, 1991). In den von ALVAREZ et al. (2001) durchgeführten Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Diffusion der lipophileren Substanz Albendazol im Parasiten deutlich höher ist als die des hydrophileren Metaboliten Albendazolsulfoxid.

Durch die zusätzliche Applikation des Enhancers kann die orale Dosis von Albendazolsulfoxid auf 20 mg pro kg Körpergewicht reduziert werden. Des Weiteren

zeigte sich, dass durch den zugesetzten Enhancer die Eiausscheidung der Versuchstiere einen Tag früher endete.

In verschiedenen Untersuchungen wurde bereits nachgewiesen, dass durch den Einsatz eines Enhancers die Effektivität eines Medikaments gesteigert werden kann (AWASTHI et al., 1997; AVADI et al., 2005; KAMIO et al., 2005). Es wurde festgestellt, dass durch den Einsatz von bestimmten Enhancern die intestinale Absorption des Wirkstoffes gesteigert wurde (AVADI et al. 2005; KAMIO et al, 2005). Die alleinige Applikation des Enhancers bewirkte aber keine Reduktion der Eiausscheidung. Dem Enhancer ist daher keine anthelminthische Wirksamkeit zuzuordnen, er steigert lediglich die Effektivität von Albendazolsulfoxid.

Im Anschluss an die Kotuntersuchung erfolgte die Sektion der behandelten Versuchstiere, um zu überprüfen ob noch Leberegel im Tierkörper festzustellen waren. Die adulten Leberegel parasitieren in der Gallenflüssigkeit, deshalb wurden die Gallengänge der frei präparierten Leber auf Leberegel untersucht. Etwa fünf bis acht Wochen nach der Infektion erreicht der Parasit die Gallengänge, dort findet die geschlechtliche Fortpflanzung und die Eiablage statt (SCHNEIDER, 2000). Die Präparation der Würmer aus den Gallengängen der Leber diente auch in vielen anderen Untersuchungen dem Parasitennachweis und der Wurmgewinnung (ROBINSON et al., 2001; BUCHANAN et al., 2002; MEANEY et al., 2003)

Es bestätigten sich die bei den Kotuntersuchungen ermittelten Ergebnisse. Bei den oral, subkutan oder intraperitoneal mit 30 mg Albendazolsulfoxid bzw. 20 mg Albendazolsulfoxid in Kombination mit Enhancer behandelten Versuchstieren wurden keine Würmer mehr festgestellt. Auch in der Gallenflüssigkeit der mit 120 mg Albendazolsulfoxid bzw. 90 mg Albendazolsulfoxid und Enhancer pour- on behandelten Tiere wurden keine Parasiten festgestellt.

## 5.2 Rasterelektronenmikroskopische Befunde

Die in dieser Arbeit vorgenommenen rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um etwaige Schäden der Wurmoberfläche festzustellen, die durch die Behandlung mit Albendazolsulfoxid bzw. Albendazolsulfoxid in Kombination mit dem Enhancer verursacht wurden.

Für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Parasiten nach ihrer Präparation aus den Gallengängen der Leber mittels einer Skalpellklinge in Vorderende, Mittelkörper und Hinterende geteilt. Bei den anschließenden REM-Untersuchungen wurden das Vorder- und Hinterende auf etwaige morphologische Veränderungen nach der Behandlung hin untersucht. Auch in vergleichbaren morphologischen Untersuchungen an *F. hepatica* mittels REM, wurden Vorder- und Hinterende des Parasiten betrachtet (VERHEYEN et al., 1980; MEANEY et al., 2004; BUCHANAN et al., 2002; STITT und FAIRWEATHER, 1993). Um zwischen Schädigung des Wurms durch die Aufbereitung und durch die medikamentöse Behandlung zu unterscheiden, wurden auch unbehandelte Kontrollen angefertigt und untersucht.

Die Behandlung der mit *F. hepatica* infizierten Ratten erfolgte mit 20 mg und mit 40 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht. Es erfolgte eine Behandlung nur mit Albendazolsulfoxid und eine Kombinationsbehandlung mit Albendazolsulfoxid und Enhancer. Die Würmer wurden nach 24 und nach 48 Stunden rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Es zeigte sich, dass bei einer höheren Wirkstoffmenge die Schäden am Wurmgewebe deutlicher hervortraten. Ähnliche Befunde ergaben sich bei Untersuchungen von mit Triclabendazolsulfoxid behandelten *F. hepatica* (STITT und FAIRWEATHER, 1993).

Des Weiteren ergab sich, dass die Schäden an der Oberfläche zunahmen je länger der Parasit mit dem Wirkstoff in Kontakt kam. Zum selben Ergebnis kamen auch BUCHANAN et al. (2002) bei ihren Untersuchungen, in denen *F. hepatica in vitro* mit Albendazolsulfoxid behandelt wurde. Bei Behandlungen von *F. hepatica* mit Clorsulon wurden ähnlich Ergebnisse ermittelt (MEANEY et al., 2004).

Durch die zusätzliche Behandlung mit dem Enhancer kam es zu einer stärkeren Schädigung des Teguments im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit der gleichen Menge Albendazolsulfoxid.

Bei den Untersuchungen ergab sich, dass die Schäden an der tegumentalen Oberfläche von *F. hepatica* am Hinterende deutlicher in Erscheinung traten als am Vorderende. Bei *in vitro* Untersuchungen von mit Albendazolsulfoxid behandelten *F. hepatica* wurde ebenfalls festgestellt, dass die Schäden am Hinterende des Wurmes deutlicher waren (BUCHANAN et al., 2002). In vergleichbaren Untersuchungen, in denen die Behandlung von adulten *F. hepatica* mit Triclabendazolsulfoxid (STITT und FAIRWEATHER, 1993) oder Closantel (VERHEYEN et al., 1980) durchgeführt wurde, waren die Schäden am Tegument ebenfalls am Hinterende deutlicher. In einer mit juvenilen Würmern durchgeführten Studie erschienen die Schäden an den mit Clorsulon behandelten Leberegeln am Vorderende stärker (MEANEY et al., 2003). Studien mit juvenilen *F. hepatica*, die mit Triclabendazolsulfoxid behandelt worden waren, ergaben keinen Unterschied zwischen Vorder- und Hinterende (STITT und FAIRWEATHER, 1993).

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte kein Unterschied in der Intensität der Schädigung am dorsalen und ventralen Tegument festgestellt werden. Das Tegument zeigte ventral und dorsal die gleichen morphologischen Veränderungen nach der Behandlung mit Albendazolsulfoxid. Auch bei der *in vitro* Behandlung von *F. hepatica* mit Albendazolsulfoxid ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem dorsalen und ventralen Tegument (BUCHANAN et al., 2002). Bei Behandlungen mit Triclabendazolsulfoxid (STITT und FAIRWEATHER, 1993) und Clorsulon (MEANEY et al., 2003) zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede am dorsalen und ventralen Tegument.

Bei den in dieser Arbeit festgestellten Schäden des Teguments handelte es sich hauptsächlich um Schwellungen und Bläschenbildung. Zusätzlich wird bei hohen Wirkstoffkonzentrationen und der zusätzlichen Applikation des Enhancers das Verschwinden von Häkchen und das Vorkommen von zytoplasmatischen Trümmern beobachtet. Bei *in vitro* mit Albendazolsulfoxid behandelten Würmern zeigte sich ebenfalls primär eine Schwellungen des Teguments sowie eine Bläschenbildung auf und zwischen den Häkchen (BUCHANAN et al., 2002).

Bei hoher Wirkstoffkonzentration und bei längerem Kontakt mit dem Wirkstoff, war das Tegument zwischen den Häkchen so stark geschwollen, dass es die Häkchen einengte und in Falten unsichtbar machte (STITT und FAIRWEATHER, 1993; BUCHANAN et al., 2002).

Die Oberfläche des Wurmes war mit Furchen durchzogen. Diese waren bei höherer Wirkstoffkonzentration und längerem Wirkstoffkontakt in größerer Anzahl festzustellen (BUCHANAN et al., 2002).

Die morphologischen Veränderungen des Teguments, wie die Schwellung und die Bläschenbildung, sowie der Verlust von Haken, wurden in anderen rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen mit fasziolid wirkenden Substanzen wie Triclabendazol und Closantel ebenfalls beobachtet (FAIRWEATHER et al., 1987; ANDERSON und FAIRWEATHER, 1995; SKUCE und FAIRWEATHER, 1990; STITT und FAIRWEATHER, 1993; MEANEY et al., 2002). Ähnliche Veränderungen wurden auch in anthelminthischen Studien mit anderen Trematoden und Zestoden festgestellt (BORGERS et al., 1975; BECKER et al., 1980; BRICKER et al., 1983). Es wird angenommen, dass die Bläschenbildung des Teguments und dessen Schwellung eine Stressreaktion des Parasiten darstellen, der Parasit versucht auf diesem Weg Schäden zu ersetzen (BRICKER et al., 1983; STITT und FAIRWEATHER, 1993).

### 5.3 Transmissionselektronenmikroskopische Befunde

Für die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Ultradünnschnitte aus dem Mittelteil von *F. hepatica* hergestellt. Bei den untersuchten Präparaten handelt es sich um Querschnitte.

Die Versuchstiere wurden mit 20 mg und 40 mg Albendazolsulfoxid pro kg Körpergewicht behandelt, des Weiteren wurden Würmer zusätzlich mit dem Enhancer behandelt. Die Präparation der Parasiten aus den Gallengängen der Leber erfolgte 24 und 48 Stunden nach der Behandlung. Um zwischen präparations- bzw. aufbereitungsbedingten Schäden und behandlungsbedingten Schäden unterscheiden zu können, wurden unbehandelte Kontrollen ebenfalls mittels TEM untersucht.

Bei den durchgeführten TEM- Untersuchungen wurden das Tegument, die Muskulatur, der Darm und das weibliche Geschlechtsorgan des Wurmes berücksichtigt.

Es wurde festgestellt, dass je länger der Wirkstoff mit dem Parasiten in Kontakt war, desto deutlicher waren die beobachteten morphologischen Schäden. In vergleichbaren Untersuchungen, in denen *F. hepatica in vitro* mit Albendazolsulfoxid behandelt wurde, zeigte sich ebenfalls, dass die Schädigung der Parasiten deutlicher wurde, je länger der Wirkstoff auf die Leberegel einwirken konnte (BUCHANAN et al., 2002). Bei Behandlungen von *F. hepatica* mit Triclabendazolsulfoxid (ROBINSON et

al., 2001), Closantel (VERHEYEN et al., 1980) und Clorsulon (MEANEY et al., 2005) wurden ähnliche Ergebnisse erzielt.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Schäden am Wurmgewebe mit zunehmender Wirkstoffmenge deutlicher wurden. Es gilt, dass je höher die Wirkstoffkonzentration ist, desto stärker wird das Gewebe des Parasiten geschädigt.

Auch aus den vergleichbaren *in vitro* Untersuchungen, in denen *F. hepatica* mit Albendazolsulfoxid behandelt wurde, ergab sich, dass die Schädigung am Parasiten mit der Wirkstoffmenge zunahm (BUCHANAN et al., 2002). Dies galt auch für die Behandlung mit Triclabendazolsulfoxid (ROBINSON et al., 2001), Closantel (VERHEYEN et al., 1980) und Clorsulon (MEANEY et al., 2005).

Bei den durchgeführten TEM- Untersuchungen wurde zudem festgestellt, dass die Würmer, die in Kombination mit Albendazolsulfoxid und Enhancer behandelt worden waren, stärker geschädigt waren als die Parasiten, die ausschließlich mit Albendazolsulfoxid behandelt worden waren.

Es ergab sich bei den in dieser Arbeit ermittelten Transmissionselektronenmikroskopischen Befunden, dass die stärksten Veränderungen am Tegument auftraten. Die festgestellten Schäden zeigten sich in Form von Vakuolen und Spalträumen. Im Synzytium kamen Mitochondrien in großer Anzahl vor, diese zeigten Formveränderungen. Bei geringer Wirkstoffmenge wurden die oben beschriebenen Veränderungen hauptsächlich basal festgestellt (BUCHANAN et al., 2002; ROBINSON et al., 2001; MEANEY et al., 2005). Durch Erhöhung der Dosis sowie längerer Einwirkzeit und den Zusatz des Enhancers breiteten sich Vakuolen bzw. Spalträume nach apikal aus.

In allen untersuchten Geweben wurden Vakuolen und Spalträume in großer Anzahl im Bereich der Basallamina beobachtet, zudem zeigte sich in hoher Dosis bzw. bei zusätzlicher Applikation des Enhancers eine Ablösung der Basallamina vom umliegenden Gewebe (BUCHANAN et al., 2002; ROBINSON et al., 2001).

Auch wurden im Darm und in den weiblichen Geschlechtsorganen kugelige Mitochondrien in großer Anzahl festgestellt (MEANEY et al., 2005).

Ein gehäuftes Vorkommen von sekretorischen Körpern wurde in allen untersuchten Geweben beobachtet (BUCHANAN et al., 2002; ROBINSON et al., 2001).

Vergleichbare Untersuchungen wurden von BUCHANAN et al. (2002) vorgenommen, dabei wurden die Behandlungen *in vitro* an aus den Gallengängen präparierten Würmern durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurde das Tegument

berücksichtigt. Es zeigte sich, dass auch *in vitro* mit Albendazolsulfoxid behandelte *F. hepatica* im Synzytium Vakuolen in großer Anzahl aufwies.

Es wurden auch hier Spalträume festgestellt. Die Schädigungen waren auch bei dieser Studie im basalen Bereich zunächst deutlicher als im apikalen Bereich des Teguments. Die Mitochondrien zeigten eine abgekugelte Form, und sie kamen ebenfalls in großer Anzahl vor. Zudem wurden sekretorische Körper festgestellt. Des Weiteren wurde auch bei diesen Untersuchungen eine Ablösung der Basallamina von dem darunter liegenden Gewebe beobachtet.

Bei den von ROBINSON et al. (2001) durchgeführten Untersuchungen, wurde *F. hepatica* mit dem Benzimidazol Triclabendazolsulfoxid behandelt. Es handelte sich hierbei um *in vitro* Untersuchungen. Bei den durchgeführten TEM- Studien wurde das Tegument untersucht. Es zeigte sich im Synzytium ebenfalls ein Vielzahl von sekretorischen Körpern. Die angetroffenen Mitochondrien erschienen geschwollen und gekugelt. Auch die Anzahl an Mitochondrien war überdurchschnittlich erhöht. Zudem ergaben sich eine Vielzahl von Vakuolen und Spalträumen im Synzytium.

In der Studie von MEANEY et al. (2005) wurde *F. hepatica* mit dem Wirkstoff Clorsulon behandelt. Es handelte sich hierbei um eine *in vivo* Studie. Bei den durchgeführten TEM- Untersuchungen wurden Tegument und Darm berücksichtigt. Im gesamten Synzytium des Teguments wurde eine generalisierte Vakuolisierung festgestellt. Es wurde ebenfalls ein Zusammenschluss von Vakuolen zu Spalträumen beobachtet. Im Tegument wurde eine Schwellung und Abrundung der in großer Anzahl vorkommenden Mitochondrien festgestellt. Des Weiteren wurden sekretorische Körper nachgewiesen. In den Darmzellen wurden ebenfalls zahlreiche Vakuolen festgestellt. Weitere morphologische Veränderungen der Darmzellen waren Schwellungen und die Abrundung der in großer Anzahl vorkommenden Mitochondrien sowie das Vorkommen von sekretorischen Körpern.

Die beschriebenen Schäden, insbesondere das Vorkommen von sekretorischen Körpern, zeigten, dass der sekretorische Transport, der verantwortlich ist für den Erhalt des apikalen Teguments, blockiert wurde (BUCHANAN, et al., 2003). Diese Blockade des Transports von sekretorischen Zellen ist ein typisches Kennzeichen für die mikrotubuläre Inhibierung (ALLAN, 1995; HIROKOWA et al., 1998; LIPPINCOTT-SCHWARZ; 1988).

Die Blockierung von sekretorischen Körpern ist ebenfalls eine typische Beobachtung nach Behandlung mit Triclabendazolsulfoxid (STITT und FAIRWEATHER, 1994).

Ähnliche Effekte wurden auch im Tegument von mit Albendazolsulfoxid behandelten Zestoden festgestellt (ASADO et al., 1996; SCHMIDT, 1998; URREA-PARIS et al., 2000).

In weiteren Studien, in denen die Wirkung von Benzimidazolen auf die Oberfläche von Zestoden, Nematoden und Protozoen untersucht wurde, zeigte sich ebenfalls eine mikrotubuläre Inhibierung (BORGERS et al., 1975; ATKINSON et al., 1980; LACLETTE et al., 1981; VERHEYEN, 1982; ZINTZ und FRANK, 1982; SANGER et al., 1985; FRANZ et al., 1990; OXBERRY et al., 1994).

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Schäden am Tegument von *F. hepatica*, wurden auch bei vorherigen Untersuchungen beobachtet, in denen *F. hepatica* sowie andere Trematoden und Zestoden mit mikrotubulären Inhibitoren behandelt worden waren (BOGITSH und CARTER, 1977; ETGES und BOGITSCH, 1985; STITT und FAIRWEATHER, 1993; STOITSAVA und GORCHILOVA, 1997; SCHMIDT, 1998; BUCHANAN et al., 2003).

Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigten die Mitochondrien typische morphologische Veränderungen. Auch in anderen Studien mit Albendazolsulfoxid wurde die Veränderung der Morphologie der Mitochondrien beobachtet (BUCHANAN et al., 2003). Untersuchungen an *F. hepatica* mit den Wirkstoffen Triclabendazolsulfoxid und Clorsulon zeigten ebenfalls morphologische Veränderungen (ROBINSON et al., 2001; MEANEY et al., 2005) der Mitochondrien.

Die Mitochondrien erschienen geschwollen und bekamen eine kugelige Gestalt. Die von BUCHANAN et al. (2002) an *F. hepatica* durchgeführten *in vitro* Untersuchungen mit Albendazolsulfoxid zeigten ebenfalls eine Schwellung und Abrundung der Mitochondrien. Die festgestellten morphologischen Veränderungen wiesen auf die gestörte Funktion der Mitochondrien hin (BUCHANAN et al., 2002). Dieselben Effekte wurden auch bei Untersuchungen mit dem Mikrotubulin- Inhibitor Colchizin beobachtet (STITT und FAIRWEATHER, 1994).

Das Schwellen der Mitochondrien deutet darauf hin, dass Albendazolsulfoxid einen störenden Effekt auf den Metabolismus des Wurms hat (BUCHANAN et al., 2002).

Es wurden sowohl im Tegument als auch in Darm und Ovar morphologische Veränderungen festgestellt, die nicht mit der mikrotubulären Inhibition im Zusammenhang gebracht werden konnten. Dazu zählten die in großer Anzahl vorkommenden Vakuolen (BUCHANAN et al., 2002). Das Vorkommen von Vakuolen wurde bei anderen Untersuchungen von fasciolid wirkenden Substanzen ebenfalls

beobachtet (STITT und FAIRWEATHER, 1994; ROBINSON et al., 2001; MEANEY et al., 2005). Diese Veränderungen wurden von einigen Autoren neben der primären Wirkung auf die Mikrotubuli als sekundäre Schädigung durch den Wirkstoff betrachtet. Sie werden als eine Stressreaktion des Parasiten angesehen (BUCHANAN et al., 2002).

#### 5.4 Beurteilung der Praktikabilität der Verfahren

##### 5.4.1 Kotuntersuchung und Sektion

Die durchgeführten Kotuntersuchungen ergaben zuverlässige Ergebnisse. Es zeigte sich, dass Ratten, die nach der Behandlung keine Eier mehr ausschieden, auch in der anschließenden Sektion keine *F. hepatica* in den Gallengängen der Leber aufwiesen. Allerdings war die Durchführung der Kotuntersuchung sehr zeit- und arbeitsaufwendig, da für jeden Versuchsansatz über 14 Tage der Kot der Tiere gesammelt werden musste. Auch die dreimalige Sedimentation jeder einzelnen Probe und die anschließende mikroskopische Untersuchung auf Wurmeier nahm viel Zeit in Anspruch.

Die anschließende Sektion der Ratten war leicht durchzuführen und wenig zeitintensiv. Auch lieferte sie ein eindeutiges Ergebnis.

##### 5.4.2 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie erwies sich als ein sehr arbeits- und zeitaufwendiges Verfahren. Sowohl REM als auch TEM wurden durchgeführt um festzustellen, welche Schäden der Wirkstoff bei *F. hepatica* verursacht. Bereits in anderen Untersuchungen wurde anhand von Elektronenmikroskopie untersucht, welche Veränderungen am Gewebe von *F. hepatica* nach Behandlung des Parasiten mit einer fasziolid wirksamen Substanz auftraten (VERHEYEN et al., 1980; STITT und FAIRWEATHER, 1993, 1994; MEANEY et al., 2005; BUCHANAN et al., 2002). Um die Ergebnisse mit anderen elektronenmikroskopischen Arbeiten vergleichen zu können, in denen *F. hepatica* mit Albendazolsulfoxid behandelt wurde (BUCHANAN et al., 2002) wurden Untersuchungen 24 und 48 Stunden nach der Behandlung durchgeführt.

Die Präparation des Parasiten für die Rasterelektronenmikroskopie konnte ohne größere Probleme durchgeführt werden. Auch die anschließenden REM-

Untersuchung und das Fotografieren der Präparate, konnte ohne Schwierigkeiten durchgeführt werden.

Bei der TEM stellte sich sowohl die Einbettung als auch die Anfertigung der Ultradünnschnitte aufgrund der Größe der Würmer als äußerst schwierig heraus. Erst nach einigen Anläufen gelang die Präparation von *F. hepatica*, da das Einbettungsmedium Schwierigkeiten hatte, den großen Parasiten zu durchdringen. Die anschließende Anfertigung der Ultradünnschnitte wurde sowohl durch die Weichheit, als auch durch die Brüchigkeit der Präparate erschwert. Auch die Auswertung am TEM erwies sich als sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

### 5.5 Schlussfolgerung

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergibt sich eine Wirksamkeit von Albendazolsulfoxid gegen *F. hepatica*. Durch den verwendeten Enhancer konnte die Wirkstoffmenge reduziert werden. Zudem kam die Eiausscheidung durch die zusätzliche Verabreichung des Enhancers einen Tag früher zum Erliegen.

In den an Ratten durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass die benötigte Wirkstoffmenge für die orale, subkutane und intraperitoneale Applikation gleich hoch war. Die Untersuchungen ergaben allerdings auch, dass für eine pour- on Behandlung eine deutlich höhere Menge an Wirkstoff und Enhancer nötig ist als für die oben genannten Applikationsarten.

Bei den an Schafen durchgeführten Untersuchungen bestätigte sich die Wirksamkeit von Albendazolsulfoxid bei oraler Applikation. Auch hier konnte die Wirkstoffmenge durch den Enhancer reduziert werden. Da für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen nur wenige Schafe zu Verfügung standen, können die ermittelten Ergebnisse nur als Anhaltspunkt dafür dienen, dass sich die bei den Ratten ermittelten Ergebnisse auf die Behandlung von Schafen übertragen lassen.

Im Rahmen der durchgeführten Schafversuche wurde ebenfalls ein Behandlungserfolg bei den pour- on mit Albendazolsulfoxid und Enhancer behandelten Tieren festgestellt. Es zeigte sich aber auch, dass diese Behandlung unpraktikabel ist. Zum einem mussten die Schafe geschoren werden, damit die Wirkstoffe direkt auf die Haut des Tieres gelangen konnten. Zum anderen waren die benötigten Mengen an Enhancer und Wirkstoff sehr hoch. Die pour- on Behandlung, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, ist sowohl zu kostenintensiv als auch zu arbeits- und zeitaufwendig.

Bei kritischer Betrachtung stellt Albendazolsulfoxid auch in den anderen Applikationsformen keine Alternative für die Behandlung von Schafen gegen *F.*

*hepatica* dar. Wie sich in dieser Arbeit bestätigte, wirkte Albendazolsulfoxid weder bei alleiniger Applikation (KNIGHT und DICKESON, 1977; JOHNS und DICKESON, 1979; VAN SCHALKWYK et al., 1979; THEODORIDES und FREEMAN, 1980; MALONE et al, 1982) noch in Kombination mit dem Enhancer gegen die juvenilen Stadien des Parasiten. Des Weiteren ist die nötige Wirkstoffmenge sehr hoch und auch nicht durch die zusätzliche Verabreichung des Enhancers ausreichend zu reduzieren, um die Anwendung von Albendazolsulfoxid wirtschaftlicher zu machen. Hinzu kommt das durch die schlechte Löslichkeit der lipophilen Substanz ein großes Volumen verabreicht werden musste.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können allerdings als Grundlage für weitere Versuchsvorhaben dienen, um Alternativen zur Behandlung des großen Leberegels zu entwickeln. Durch die drohenden Resistenzen von *F. hepatica* gegen Triclabendazol (ROBINSON et al., 2004) wird es nötig sein, weitere gut wirksame und einfach zu verabreichende fasziolid wirksame Medikamente zu entwickeln.