

6. SUMMARY / ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

SUMMARY

Haemonchus contortus excretory/secretory (ES) products were tested on ovine abomasal tissue *in vitro* to examine the hypothesis of a direct chemical influence of the parasite on the host, causing hypergastrinaemia and/or hyperpepsinogenaemia, which are regular consequences of haemonchosis.

ES products were prepared by incubating parasites at different stages of the life cycle in a range of media. Parasites were recovered from abomasal contents by an agar migration method between 4 days and 5 months post-infection. The incubation media were based on saline and Hank's Balanced Salt Solution over a range of pH. The incubates were tested in a static incubation system on antral (gastrin secretion) and fundic (pepsinogen secretion) mucosal tissue segments.

The survival of *Haemonchus contortus* at different stages of its life cycle *in vitro* was examined in a range of solutions including the incubation media mentioned above. Fourth stage larvae and adult worms died quickly (mostly within 24 hours) in water and at low pH and survived best (approximately 40 - 80 % alive after 48 hours) in Hank's solution at a pH between 4.5 and 7.4. Third stage larvae survived much longer than the more mature stages in all media, they began to die in water and at low pH after 5 days, but were still over 80 % alive in all other media after 2 weeks.

ES products, tested at 20 %, 40 % and 100 % concentrations, showed no effect on, or inhibited gastrin secretion. Microorganisms might have contributed to or caused this inhibition, as incubated solutions inoculated with abomasal contents but without contact with parasites inhibited gastrin secretion by up to 90 %. However, live worms, while suspended in media containing antibiotics, also inhibited gastrin secretion. A separation of ES products into charged compounds,

including aminoacids and small peptides, and non-charged compounds, and subsequent testing of both fractions, suggested that the active substance in the incubates is associated with the charged compounds.

None of the ES products, tested in 20 %, 40 % or 100 % concentrations or separated into charged and non-charged fractions, had an influence on pepsinogen secretion. Live worms, however, stimulated pepsinogen secretion by 10 - 30 %.

The results of this study do not support the hypothesis of a direct influence of *Haemonchus contortus* excretory/secretory products on gastrin secretion. The evidence for a direct chemical effect of the parasite on pepsinogen secretion remains inconclusive.

ERWEITERTE ZUSAMMENFASSUNG

Elke Haag: Die Wirkung von Exkretions- und Sekretionsprodukten von *Haemonchus contortus* auf die Labmagensekretion.

ZIELSETZUNG

Die Hämonchose des Schafes ist regelmäßig von erhöhten Gastrin- und Pepsinogenwerten im Serum und verminderter Säuresekretion im Labmagen begleitet. Unklar ist dabei, wie der Labmagenparasit *Haemonchus contortus* diese Veränderungen verursacht. Einer Theorie zufolge könnten Exkretions- und Sekretionsprodukte (ES-Produkte) des Parasiten direkt auf das Labmagengewebe einwirken und Gastrin- und Hauptzellen stimulieren und/oder Belegzellen hemmen. Diese Theorie sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden ES-Produkte von *Haemonchus contortus* gewonnen und ihre Wirkung auf Gastrin- und Pepsinogensekretion an Labmagengewebe *in vitro* getestet. Ferner wurde die Überlebensrate des Parasiten *in vitro* in verschiedenen Inkubationsmedien bestimmt.

HERSTELLUNG VON ES-PRODUKTEN

Spendertiere wurden mit infektiösen Drittlarven von *Haemonchus contortus* infiziert und nach festgesetzten Zeiträumen (zwischen 4 Tagen und 5 Monaten nach Infektion) geschlachtet. Die dem Zeitraum nach Infektion entsprechenden Stadien des Parasiten wurden mittels einer Agargelmethode aus dem Labmageninhalt zurückgewonnen und in 50 ml oder 25 ml verschiedener Lösungen inkubiert (Kochsalzlösung mit oder ohne Glukose, Hanks ausgewogene Salzlösung mit pH 2,5, 5 und 7,4, teils mit Antibiotika). Entscheidete Drittlarven wurden ebenfalls inkubiert. Die Inkubationsmedien wurden nach 2 Stunden gewechselt. Die fertigen ES-Produkte umfaßten Inkubate von 9 verschiedenen Populationen von entscheideten Drittlarven bis hin zu rein adulten Würmern.

ÜBERLEBENSRATE VON *HAEMONCHUS CONTORTUS* IN VITRO

Entscheidete Drittlarven, späte Viertlarven und adulte Würmer wurden in einer Reihe von Lösungen bei 37 °C inkubiert und die Anzahl lebender und toter Parasiten über einige Tage bis zu 2 Wochen (für die Drittlarven) bestimmt. Die Inkubationsmedien umfaßten alle Lösungen, die zur Herstellung von ES-Produkten benutzt wurden, sowie zusätzlich deionisiertes Wasser, Kochsalzlösung mit 25 % Blut eines Spendertieres und eine umfangreichere Skala von Hanks ausgewogener Salzlösung mit verschiedenen pH-Werten. Alle Stadien des Parasiten starben zuerst in Wasser und bei niedrigem pH-Wert (2,5) und überlebten am besten in Kochsalzlösung mit Blut (nicht getestet für Drittlarven) und in ausgewogener Salzlösung bei hohen pH-Werten (4,5 - 7,4). Dies warf die Frage auf, wie die Parasiten im Labmagen mit natürlichen pH-Werten zwischen 2,0 und 3,0 überleben und läßt vermuten, daß die gehemmte Säureproduktion während einer Hämonchose dem direkten Vorteil des Parasiten dient.

Entscheidete Drittlarven tolerierten alle Inkubationsmedien besser als die späteren Stadien; abgesehen von den Larven in Wasser und bei niedrigem pH-Wert waren die Drittlarven in allen Medien nach 2 Wochen zu über 80 % noch am Leben. Fast alle Viertlarven und adulten Würmer starben in Wasser und bei niedrigem pH-Wert in den ersten 24 Stunden. In den günstigsten Medien lebten nach 48 Stunden noch 40 - 80 % der Parasiten.

IN-VITRO-TESTMETHODE

Segmente der Labmagenschleimhaut aus Fundus (für Pepsinogensekretion) und Antrum (für Gastrinsekretion) eines frisch geschlachteten Schafes wurden in Lösungen mit ES-Produkten inkubiert und die resultierenden Pepsinogen- oder Gastrinkonzentrationen dieser Lösungen mit der Sekretion von Gewebestücken in einer Kontrollösung verglichen. Durch pharmakologische Studien mit Carbachol und Histamin wurde sichergestellt, daß die Gewebestücke in dieser Testmethode auf Stimulation ansprechen und mit entsprechend vermehrter

Sekretion auf wachsende Konzentration der Testsubstanz reagieren. Die Gastrinsekretion zeigte sich in dieser Testmethode gegenüber Osmolaritäts- und pH-Veränderungen sehr sensibel. Um zu garantieren, daß eine veränderte Labmagensekretion beim Testen der ES-Produkte tatsächlich durch Substanzen verursacht wurde, die vom Parasiten produziert worden waren, wurden auch die reinen Inkubationslösungen an Labmagengewebe getestet und die Ergebnisse als Standard für statistische Vergleiche mit den Ergebnissen der ES-Produkte benutzt.

Routinemäßig wurden ES-Produkte an Labmagengewebe von Schafen getestet, die Feldinfektionen ausgesetzt waren. Einige ES-Produkte wurden zum Vergleich zusätzlich an parasitennaivem Labmagengewebe getestet. Die Ergebnisse erbrachten keinen Unterschied zwischen den zwei Gewebstypen. Somit scheint der Gebrauch von Gewebe, das bereits Kontakt zu Parasiten hatte, gerechtfertigt.

WIRKUNG VON ES-PRODUKTEN AUF DIE GASTRINSEKRETION

ES-Produkte wurden routinemäßig nach einer Lagerzeit von bis zu 24 Stunden bei 4 °C oder einigen Wochen bei -70 °C in 20%iger oder 40%iger Konzentration an Labmagengewebe getestet. Viele Inkubate zeigten keine signifikante Wirkung auf die Gastrinsekretion, sehr wenige stimulierten sie, und einige, insbesondere in Hanks Lösung bei pH 7,4 hemmten sie. Der Stimulation wurde keine Bedeutung beigemessen, da sie nur sporadisch bei vereinzelt ES-Produkten auftrat. Die Hemmung der Gastrinsekretion könnte zum Teil oder ganz durch Verunreinigung mit Mikroorganismen verursacht worden sein, da die Inkubation von Labmagenflüssigkeit in Kontrollösung (ohne Kontakt zu Parasiten) ebenfalls in bis zu 90 % verminderter Gastrinsekretion resultierte und einige ES-Produkte aus Inkubationslösung mit Antibiotika nicht diesen hemmenden Effekt zeigten. Wurmextrakt (homogenisierte Parasiten) hemmte ebenfalls die Gastrinsekretion. Dies läßt darauf schließen, daß etwaige tote Würmer in den Inkubationen zu den hemmenden Eigenschaften der ES-Produkte beitragen.

In einem einmaligen Versuch wurde ein frisch gewonnenes ES-Produkt in 100%iger Konzentration an Labmagengewebe getestet und lebende Würmer wurden direkt in das Testsystem verbracht. Beide Experimente ergaben deutlich verminderte Gastrinsekretion, die aufgrund der Anwesenheit von Antibiotika in diesem Fall nicht durch Mikroorganismen verursacht sein konnte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch die Parasiten selber eine Substanz freisetzen, welche die Gastrinsekretion hemmt.

Fünf verschiedene ES-Produkte wurden in polare und nicht-polare Fraktionen getrennt und die in der polaren Fraktion enthaltenen geladenen Substanzen, inklusive Aminosäuren und kleineren Peptiden, separat von den in der nicht-polaren Fraktion enthaltenen ungeladenen Verbindungen an Labmagengewebe getestet. Die Ergebnisse der mit getrenntem Material durchgeführten Versuche ließen vermuten, daß die aktive Substanz unter den geladenen Verbindungen zu finden ist.

Die Resultate dieser Studie widersprechen der Theorie eines direkt stimulierenden Einflusses von parasitären ES-Produkten auf die Gastrinzellen. Zukünftige Forschung sollte sich auf die verminderte Säureproduktion konzentrieren, welche an sich der Ursprung der hohen Gastrinwerte sein könnte. Der überraschende Befund einer Hemmung der Gastrinsekretion, möglicherweise durch Mikroorganismen oder durch die Parasiten selber, bedarf weiterer Klärung.

WIRKUNG VON ES-PRODUKTEN AUF DIE PEPSINOGENSEKRETION

ES-Produkte, ungeachtet ihrer Konzentration oder ob getrennt in polare und nicht-polare Fraktionen, zeigten keinen Einfluß auf die Pepsinogensekretion. Lebende Würmer unmittelbar im Testsystem stimulierten die Sekretion jedoch. Angesichts der geringen Verfügbarkeit adulter Würmer konnte letzteres nur einmal getestet werden, und die erhaltenen Ergebnisse bedürfen der Bestätigung. Ein stimulierender Einfluß von *Haemonchus contortus* auf Hauptzellen ist somit noch ungewiß.