

Mikroalgen der Spezies *Chlorella vulgaris* – ein Naturprodukt mit in Europa bisher unbeachtetem pharmazeutischen Potential

Einleitung

Algen gehören phylogenetisch zu den ältesten eukaryotischen Organismen auf unserem Planeten. Fossile Spuren dieser Lebensformen lassen sich bis in das Präkambrium zurückverfolgen und werden auf 2,5 Milliarden Jahre datiert. Mit ihrer Photosyntheseleistung trugen sie wesentlich dazu bei, den CO₂ – Gehalt der Uratmosphäre zu verringern und somit die Basis für die weitere Entfaltung des Lebens auf der Erde zu schaffen. Algen haben nahezu alle Lebensräume besiedelt, sie sind sowohl in marinen als auch limnischen Habitaten, in heißen Quellen, in Schnee, Eis und in den oberen Bodenschichten zu finden. Es existieren sich freischwebend entwickelnde Arten, am Grund von Gewässern festsitzende Vertreter, Epiphyten und auch solche mit ausgeprägter symbiotischer Lebensweise.

Unter dem Begriff Algen versteht man heute alle thallose, zur autotrophen Ernährung befähigten Organismen ohne Gonitangien innerhalb der Eucaryota, die sich in 6 eigenen Abteilungen sowie 8 Klassen beschreiben lassen ^[1]. Häufig ist schon durch die differierende Kombination der Assimilationsfarbstoffe die jeweilige Zugehörigkeit erkennbar (z. B. Rhodophyta, Chlorophyceae, Xanthophyceae).

Die früher gebräuchliche, simplifizierende Zuordnung der Algen zu einer eigenen Abteilung im Pflanzenreich mit einer Unterteilung in 10 Klassen konnte nicht mehr aufrecht erhalten werden.

Ca. 40.000 Algenarten sind zur Zeit bekannt, die in ihrer Formenvielfalt von nur wenige Mikrometer kleinen, in jeder Pfütze existierenden Einzellern bis zu komplexen, vielzelligen über 100 m langen Vertretern, wie z. B. den die kälteren Meere der Südhalbkugel besiedelnden *Macrocystis*-Arten, reichen. Diese Vielfalt spiegelt sich auch in den Vermehrungsstrategien der Algen wider. Von der ungeschlechtlichen, vegetativen Fortpflanzung bis hin zur Oogamie sind alle Formen vertreten.

Algen besitzen, abgesehen von ihrer Schlüsselposition in der Nahrungskette, ein bedeutendes ökonomisches Potential, wobei unter historischen Gesichtspunkten die Nutzung vorwiegend mariner makroskopischer Algen als Nahrungs- und Futtermittel im Vordergrund steht. So dienen in Japan Braunalgen der Gattungen *Laminaria* und *Undaria* sowie Rotalgen der Gattung *Porphyra*, dort nachweislich schon seit dem 18. Jahrhundert kultiviert, als Nahrungsquelle („Kombu“, „Wakabe“). An den Küsten West- und Nordwesteuropas bilden die riesigen, an das Ufer geworfenen Tangmassen den Grundstoff der Kelpindustrie und werden vorwiegend zu Dünger und Soda verarbeitet, dienen als Jodquelle (*Fucus serratus*) oder als Ausgangsstoff zur Alginatproduktion (*Ascophyllum nodosum*).

Einzellige Mikroalgen führten dagegen hinsichtlich einer potentiellen wirtschaftlichen Verwertung eher ein Schattendasein. Erst mit dem genialen Einfall Otto Warburgs im Jahr 1919, Algen der Gattung *Chlorella* für seine grundlegenden Untersuchungen zur Photosynthese einzusetzen ^[2], begann man sich in zunehmendem Maße auch anderweitig für diese mikroskopisch kleinen Organismen zu interessieren, so daß die *Chlorella* heute mit zu den am intensivsten untersuchten Organismen zählt. Schnell wurde man auf den hohen Eiweiß- und Lipidgehalt dieser im Süßwasser kultivierbaren Mikroalgen aufmerksam.

Chlorella vulgaris – eine zur industriellen Kultivierung geeignete planktische Mikroalge

Auf der Suche nach alternativen Nahrungs- und Energiequellen erkannten Wissenschaftler in den Industrienationen ca. um 1940 das ausgezeichnete ernährungsphysiologische Potential dieser Grünalge (Abt. Chlorophyta / Kl. Chlorophyceae / O. Chlorococcales). Versuche zur industriellen Nutzung scheiterten aber immer wieder an den mit der Kultivierung verbundenen hohen Kosten. Eine Ausnahme bilden einige asiatische Länder wie Japan oder Taiwan, die auf Grund der günstigen klimatischen Bedingungen, verbunden mit der traditionellen Akzeptanz von Algenprodukten durch die einheimische Bevölkerung, Chlorella-Algen in großem Umfang (Handelsvolumen gegenwärtig ca. 500 Mio. US \$ pro Jahr) in diversen Freilandanlagen kultivieren. Bis Mitte 2000 stammten auch alle in Deutschland erhältlichen Chlorella – Produkte aus dieser Region.

Gegenwärtig werden ca. 30 Chlorella–Arten mit einer Vielzahl von Stämmen weltweit in Forschungseinrichtungen kultiviert und als Reinkulturen vertrieben, in industriell genutzten Kulturen finden aber nur wenige Arten Verwendung.

Hinsichtlich einer industriellen Nutzung hat sich Chlorella vulgaris als besonders geeignet erwiesen. Chlorella vulgaris, bis vor wenigen Jahren unter anderem auch unter dem nicht mehr existenten Taxon Chlorella pyrenoidosa geführt ^[3] ^[4], wächst sowohl unter phototrophen als auch mixotrophen Bedingungen bei Einhaltung von für diese Alge günstigen Kultivierungsbedingungen äußerst rasch und aggressiv, so daß sich ein Befall der Kultur mit parasitären oder konkurrierenden, potentiell schädlichen Fremdorganismen gut beherrschen läßt.

Mit einem Zelldurchmesser von ca. 5 – 10 µm ist die kugelförmige Mikroalge in ihren Abmessungen in etwa den roten Blutkörperchen (7,5 µm) vergleichbar. In der kugelförmigen Gestalt in Kombination mit der dreischichtigen, aus Hemizellulose unterschiedlicher Zusammensetzung ^[5] bestehenden sehr robusten Zellwand ist die Ursache für die außerordentliche mechanische Stabilität dieser Alge, sie übersteht Druckbelastungen bis zu 600 bar, zu suchen. Diese Eigenschaften prädestinieren Chlorella vulgaris für die Kultivierung im industriell relevanten Maßstab, da eine derartige Kultivierung zwangsläufig mit einer beträchtlichen mechanischen Beanspruchung der inokulierten Organismen durch die möglichst turbulent strömende Kultivierungslösung und die dazu erforderlichen Pumpprozesse verbunden ist. Zellzerstörungen würden sofort einem Bakterienbefall der Kultur Vorschub leisten und die Qualität der erzeugten Biomasse negativ beeinträchtigen.

Chlorella vulgaris – eine winzige Alge mit gigantischen Eigenschaften

Besonders auffallend an der Chlorella ist ihre hohe Reproduktionsrate. Eine einzelne Mutterzelle teilt sich innerhalb von 16 – 20 Stunden in 4 Tochterzellen, die sich wiederum innerhalb der nächsten 16 – 20 Stunden nach dem gleichen Muster vervielfachen. Hinsichtlich des pro m² und Zeiteinheit möglichen Biomasseertrags ist die Chlorella allen bekannten Nutzpflanzen um ein Vielfaches überlegen. Berücksichtigt man noch die einzigartigen ernährungsphysiologischen Eigenschaften dieser Biomasse, ist es verständlich, warum sowohl Kultivierungsbedingungen als auch Einsatzmöglichkeiten nun auch in Regionen, in denen der Mikroalgenkonsum nicht traditionell verankert ist, intensiv untersucht werden.

Chlorella enthält große Mengen an Chlorophyll, Aminosäuren, Nucleinsäuren, Enzymen, Fetten, Vitaminen, Ballaststoffen und Mineralien. So besitzt sie mit bis zu 4 % in der Trockenmasse den höchsten Chlorophyllgehalt von allen Nahrungsmitteln. Das Aminosäurespektrum (zwischen 40 und 50 % in der Trockenmasse) deckt in ausgewogenem Maße die 20 proteinogenen Aminosäuren ab (einschließlich aller 8 für den Menschen essentiellen Aminosäuren) [Tabelle 1].

| Proteinogene Aminosäuren (20) <u>essentiell</u> (8) ^{*)} | % Anteil an Trockenmasse |
|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Glycin | 1,4 – 2,3 |
| Alanin | 2,0 – 3,1 |
| Valin | 1,5 – 2,3 |
| Leucin | 2,1 – 3,0 |
| Isoleucin | 1,0 – 1,8 |
| Phenylalanin | 1,1 – 2,1 |
| Tyrosin | 0,8 – 1,4 |
| Prolin | 0,9 – 1,5 |
| Histidin | 0,7 – 1,1 |
| Tryptophan | 0,1 – 0,4 |
| Serin | 1,1 – 1,7 |
| Threonin | 1,3 – 2,0 |
| Cystein | 0,3 – 0,4 |
| Methionin | 0,5 – 0,8 |
| Arginin | 1,4 – 3,0 |
| Lysin | 1,4 – 2,3 |
| Asparaginsäure / Asparagin | 2,1 – 3,5 |
| Glutaminsäure / Glutamin | 3,1 – 5,6 |

[Tab.1]

Die von der Chlorella vulgaris synthetisierten Fette (10 – 15 % in der Trockenmasse) bestehen zu ca. 80 % aus ungesättigten Fettsäuren, wobei α -Linolensäure mit über 30 % den Hauptanteil darstellt [Tabelle 2].

| Fettsäuren (Auswahl) ^{*)} | (mg / 100 g) | |
|--------------------------------------------|---------------------|-------------------|
| Vertreter C ₄ – C ₁₀ | < 1 | |
| Laurinsäure | 1 - 80 | C ₁₂ |
| Myristinsäure | 50 – 100 | C ₁₄ |
| Palmitinsäure | 300 – 700 | C ₁₆ |
| Palmitoleinsäure | 40 – 300 | C _{16:1} |
| Stearinsäure | 20 – 300 | C ₁₈ |
| Ölsäure | 310 – 1300 | C _{18:1} |
| Linolsäure | 150 – 800 | C _{18:2} |
| (α) – Linolensäure | 300 – 1700 | C _{18:3} |
| Stearidonsäure | 60 – 450 | C _{18:4} |
| Arachidonsäure | 10 – 15 | C _{20:4} |

[Tab.2]

Bei den Vitaminen ist der hohe Gehalt an den Vertretern der B-Gruppe besonders erwähnenswert, aber auch antioxidativ wirkende Vertreter wie Vitamin C, Vitamin A und β -Carotin als dessen Vorstufe sind in großen Mengen enthalten [Tabelle 3].

| Vitamine und deren Vorstufen (Auswahl) ^{*)} | mg / 100g |
|-------------------------------------------------------------|------------------|
| β - Carotin: | 3,0 – 11 |
| Vitamin E | 3,6 – 10 |
| B ₁ | 0,5– 1,0 |
| B ₂ | 3,2 – 3,6 |
| B ₆ | 3,5 – 3,8 |
| B ₁₂ | 0,1 – 0,2 |
| C | 10 – 20 |

[Tab. 3]

^{*)} Durchschnittliche Werte der in der Produktionsanlage Klötze (Altmark) erzeugten Biomasse

Chlorella vulgaris – eine Alge mit komplexen physiologischen Wirkungen

Die Hypothese, daß eine ausreichende Versorgung des menschlichen Organismus mit ungesättigten Fettsäuren bei gleichzeitiger Anwesenheit von Antioxidantien eine präventive Wirkung bezüglich der Ausbildung koronarer Herzerkrankungen besitzt, wird allgemein akzeptiert.

Die gesundheitsstabilisierenden Effekte nach Aufnahme der Chlorella lassen sich aber nur schwer über die Wirkung der ernährungsphysiologisch relevanten Inhaltsstoffe allein erklären, zumal die im Normalfall dem Organismus durch die Algenapplikation (ca. 0,1 – 1 % bezüglich der gesamten Nahrungsaufnahme) zugeführte Menge verhältnismäßig gering ist. Dementsprechend wurden in den letzten Jahren verstärkt Untersuchungen zur Identifikation weiterer physiologisch wirksamer Komponenten durchgeführt. Hauptaugenmerk wurde dabei auf durch Extraktion der Chlorella mit z. B. Wasser, Aceton oder CO₂ erhältliche, aus Nukleinsäuren, Peptiden, Enzymen und Vitaminen bestehende Gemische, in populärwissenschaftlichen Berichten häufig als „Chlorella Growth Factor“ bezeichnet, gerichtet.

Sowohl die Extrakte, als auch aus diesen gewonnene und identifizierte Einzelkomponenten, zeigen in einer Vielzahl von Versuchen ausgeprägte gesundheitsstimulierende Effekte, die sich in den meisten Fällen auf eine positive Beeinflussung des Immunsystems zurückführen lassen.

Die Verfügbarkeit der Inhaltsstoffe ist aber auch bereits aus intaktem Zellmaterial ausreichend ^[6] gegeben. Ein Zellaufschluß, z. B. durch geeignete Mahlprozesse, erhöht die Verwertung nur unwesentlich ^[7].

In der folgenden Zusammenstellung sind grundlegende, durch Chlorella- Applikation zu erreichende und in der medizinischen Fachliteratur an Exaktversuchen dokumentierte Wirkungen aufgeführt. Da sich auf Grund der komplexen Zusammensetzung der Chlorella ein Großteil der beobachteten Effekte nicht einer konkreten Einzelkomponente zuordnen läßt bzw. viele Komponenten äußerst komplex wirken, erfolgt eine Systematisierung der positiven Wirkung von Chlorella entsprechend pathogener Einwirkungen bzw. indizierter Symptome.

A) Chlorella vulgaris – ein die Hämatopoese stimulierender Immunmodulator ?

Basierend auf Beobachtungen, daß Personen, die regelmäßig Mikroalgen konsumieren, scheinbar eine geringere Anfälligkeit gegenüber einer Reihe von Infektionskrankheiten zeigen, wurden Mitte der sechziger Jahre in Japan erste systematische Untersuchungen zu diesem Phänomen durchgeführt. Eine über ein Vierteljahr geführte Feldstudie an ca. 1000 Marinesoldaten erbrachte das überraschende Ergebnis, daß sich für die Mitglieder der Testgruppe, denen täglich 2 g Mikroalgen pro Person verabreicht wurden, das Erkältungsrisiko um 25 % reduzierte ^[8].

KOJIMA et al. konnten 1973 zeigen, daß bei Ratten, denen ein Chlorella – Extrakt (CVE) und 24 Stunden darauf Kohlenstoffpartikel injiziert wurden, ein beträchtlich schnellerer Konzentrationsabfall von Kohlenstoffpartikeln im Blut zu beobachten war, als bei der nicht mit Algen behandelten Kontrollgruppe. Die Autoren machten eine erhöhte Makrophagenaktivität dafür verantwortlich ^[9].

TANAKA et al. beobachteten 1986 bei intraperitoneal mit Escherichia coli inokulierten Mäusen eine gegenüber der Kontrollgruppe beschleunigte Eliminierung der

Bakterien in der Milz, wenn den Mäusen vor der Infektion wäßrige *Chlorella vulgaris* – Extrakte (**CVE**) injiziert (intraperitoneal, intravenös, subcutan) wurden. Zeitgleich mit der beschleunigten Bakterieneliminierung konnten die Autoren eine verstärkte Chemokinese polymorphnukleärer Leukozyten sowie eine erhöhte Superoxidbildungsrate feststellen^[10].

Vergleichbare, auf eine Stärkung der unspezifischen zellulären Abwehr hinweisende Effekte, lassen sich auch bei oraler Applikation von **CVE** erzeugen^[11].

Werden Mäuse, denen über einen Zeitraum von 10 Tagen oral **CVE** appliziert wurde, intraperitoneal mit *Listeria monocytogenes* infiziert, ist die Anzahl der detektierbaren Bakterien sowohl in der Bauchhöhle als auch in der Milz signifikant niedriger, als in der Kontrollgruppe. An dieser Stelle sei daran erinnert, daß Listerien sich im Wirtskörper verbreiten, indem sie sich in den Makrophagen einnisten und unter Zerstörung des mononukleären Phagozytosesystems diesen Teil der Immunabwehr selbst zur Vermehrung nutzen. Die Abwehr derartiger intrazellulärer Parasiten erfolgt über T-Zellen – vermittelte Makrophagenaktivierung^[12].

Dementsprechend konnten die Autoren eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte γ/δ -T-Zellen – Aktivität in der ersten Phase der Infektion sowie später eine erhöhte α/β -T-Zellen – Aktivität nachweisen^[13].

Bei präventiver oraler Applikation von *Chlorella vulgaris* – Biomasse (**CVB**) an mit *Listeria monocytogenes* infizierte Mäuse erfolgt ein gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhter Anstieg der Aktivität der natürlichen Killerzellen bei allen mit **CVB** gefütterten Tieren. Bei Applikation von **CVB** an Mäuse, denen eine in der nicht **CVB** gefütterten Kontrollgruppe 100 % letale Dosis Listerien verabreicht wurde, war eine dosisabhängige Überlebensrate von bis zu 50 % zu beobachten. Die Immunstimulation erfolgt weiterhin über eine Zunahme an CFU – GM („granulocyte-macrophage colony-forming unit“) im Knochenmark unter gleichzeitiger Erhöhung der koloniestimulierenden Serumaktivität^{[14][15]}.

Auch durch Anwendung von Immunsuppressoren in ihrer Abwehr geschwächte Organismen lassen sich durch *Chlorella* – Applikation stabilisieren.

Verabreicht man mit Cyclophosphamid neutropenierten Mäusen subkutan^[16] bzw. Ratten oral^[17] **CVE**, beginnen sich verstärkt neutrophile Granulozyten zu bilden. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß **CVE** nicht nur gereifte Leukozyten aktiviert, sondern auch die blutbildenden Stammzellen im Knochenmark stimuliert.

Untersuchungen von KONISHI et al.^[18] bestärken diese Hypothese. Durch präventive Applikation eines aus **CVE** isolierten sauren Glycoproteins an Mäuse mit mittels 5-Fluorourazil (5FU) induzierter Myelosuppression läßt sich neben einer erhöhten Resistenz gegenüber endogenen Infektionen eine rasche Erholung der Hämatopoese beobachten. Die Autoren stellen als mögliche Ursache eine **CVE** – induzierte beschleunigte Stammzellendifferenzierung und eine damit einhergehende 5FU-Resistenz zur Diskussion. Der Effekt tritt sowohl an tumortragenden als auch an normalen Mäusen auf. Da die geschilderten Effekte bei tumortragenden Mäusen ohne negative Beeinflussung der therapeutischen Wirkung von 5FU bei gleichzeitiger **CVE** – dosisabhängiger Erhöhung des LD₅₀ – Wertes eintreten, ergeben sich interessante Konsequenzen für die Chemotherapie maligner Tumore.

Unter dem Gesichtspunkt einer mit großer Wahrscheinlichkeit vorliegenden Unterstützung zellvermittelter Immunreaktionen durch *Chlorella* – Applikation ist eine positive Wirkung der Algeninhaltsstoffe auf das Immunsystem von Organismen mit definiert gestörter zellvermittelter Immunantwort zu erwarten.

HASEGAWA et al.^{[19] [20] [21]} zeigen, daß sich die opportunistische Infektion mit *Listeria monocytogenes* von MAIDS – Mäusen (murine acquired immunodeficiency

syndrom) durch präventive orale **CVE** – Gaben unterdrücken läßt. Es wird die Hypothese aufgestellt, daß sich durch die Verabreichung von **CVE** die γ -Interferon-Sekretion via Th-1 Zellen erhöht. Diese ist wiederum an eine Makrophagenaktivierung und damit verstärkte Bildung von Interleukin 12 gekoppelt, was letztendlich zu einem Wiedererlangen der Empfindlichkeit gegenüber Listeria – spezifischen Antigenen führt. Sowohl die verstärkte γ -Interferon – Sekretion als auch der erhöhte Zytokingehalt sind nachweisbar.

Auch gegenüber Virusinfektionen ist bei Chlorella – Applikation eine Aktivierung zellvermittelter Immunreaktionen zu beobachten. Spritzt man ICR-Mäusen 1 – 3 Tage vor einer Infektion mit Zytomegalieviren **CVE**, überleben die Tiere die sonst tödliche Infektion. Der schützende Effekt von **CVE** zeigt sich primär in einer verringerten Replikationsrate der Viren in den befallenen Zielorganen, einhergehend mit einem Schutz vor histopathologischen Zerstörungen. Seruminterferonlevel und daraus resultierend auch die 2`5`-Oligoadenylatsynthetase – Aktivität erhöhen sich in den **CVE** – behandelten Zytomegalie – Mäusen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Weiterhin steigt die NK – Aktivität der Milzzellen, die bei unbehandelter Infektion abnehmen würde. In vitro zeigt **CVE** keinerlei virocidale bzw. virostatische Wirkungen gegenüber Zytomegalieviren ^[22].

Unter Berücksichtigung der bei Chlorella – Aufnahme eintretenden Aktivierung des Immungeschehens ist auch die positive Beeinflussung der Homöostase unter Streßbedingungen interpretierbar.

So konnten TANAKA et al. ^[23] durch orale Applikation von **CVB** einen signifikanten prophylaktischen Effekt bei der Behandlung von peptischem und streßinduziertem Ulcus im Tierversuch erzielen. Werden psychisch gestreßte Mäuse mit **CVE** gefüttert, ist eine Reduktion der Apoptose in deren Thymoszellen beobachtbar (HASEGAWA et al. ^[24]).

MARCHANT et al. ^[25] berichten in einer Pilotstudie über positive Effekte bei supplementärer Gabe von **CVB** an Patienten mit Fibromyositis.

B) Chlorella vulgaris – eine Mikroalge mit Perspektiven in der Therapie maligner Tumore?

Aus der voranstehend zitierten Literatur geht hervor, daß sich durch Verabreichung von Chlorella vulgaris sowohl in unzerstörter Form als auch als glycoproteinreicher Extrakt eine Reihe ausgeprägter immunmodulatorischer Effekte erzielen lassen, die via stimulierter Hämatopoese und beschleunigter Stammzellendifferenzierung ein Erstarren der zellvermittelten Immunität sowie ein Ansteigen der Makrophagenaktivität in den entsprechenden Wirtsorganismen zur Folge haben.

(Siehe auch G. Z. JUSTO et al. ^[58]) Antitumorale Effekte sind dementsprechend vorrangig unter dem Aspekt der Stimulation körpereigener Abwehrkräfte zu erwarten. In neueren Untersuchungen gelang es aber auch, Substanzen wie z. B. diverse Sterole ^[26] und Glycerolglycolipide ^[27] aus der Chlorella zu isolieren und deren inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Tumoren nachzuweisen.

Sowohl bei oraler Applikation von **CVB** ^[28]^[29] an als auch durch Injektion von **CVE** in mit transplantierbaren Meth-A – Tumorzellen inokulierte Mäuse ^[30] erhöht sich die Lebensdauer der Versuchstiere signifikant. Die Mäuse entwickelten eine antigenspezifische, durch zytostatische T – Zellen übermittelte Immunität. Zytotoxische T – Zellen sowie NK – Zellen selbst leisten keinen Beitrag zur Resistenz ^[29].

NODA et al. gelang der Nachweis, daß die entsprechenden Effekte an ein aus **CVE** in beträchtlichen Mengen isolierbares Glycoprotein gekoppelt sind. Es gelang eine

Fraktion zu separieren, die das Tumorwachstum vollständig unterband. Als Wirkstoff beschreiben die Autoren ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 63,1 kDa, welches zu ca. 65 % aus Kohlenhydraten, hauptsächlich β -1,6-D-Galaktopyranose besteht. Der Proteinanteil von ca. 30 % setzt sich aus 15 Aminosäuresequenzen zusammen^[31]. Als wirksame Sequenz konnte nach enzymatischer Abspaltung der Kohlenhydrate die Proteineinheit identifiziert werden. Sowohl nach 30 min Autoklavieren auf 130 °C als auch nach kurzzeitiger Einwirkung von verdünnten Säuren und Basen bleibt die Aktivität erhalten. Der Antitumor – Effekt der Glycoproteinfraktion ist dem von diversen kommerziell erhältlichen und etablierten, schon in der Immuntherapie von Krebs verwendeten Immunmodulatoren (z. B. OK-432 bzw. „PICIBANIL“ aus *Streptococcus pyogenes*;^[32] und PSK aus *Coriolus versicolor*;^[33]) vergleichbar und partiell überlegen^[34].

Das beschriebene Glycoprotein hemmt effektiv sowohl eine spontane als auch die experimentell induzierte Metastasierung von Meth-A – Fibrosarkomen in BALB/c – Mäusen sowohl bei intratumoraler als auch bei subkutaner Injektion^[34]. Da die Suppression der Metastasierung an athymischen Nacktmäusen nicht beobachtbar war, ergibt sich erneut die Schlußfolgerung, daß der von den Autoren als „antitumor immunopotentiating principle“ bezeichnete Effekt über eine T – Zellenaktivierung verläuft.

Im Hinblick auf eine potentielle Anwendung in der Therapie diverser Tumore sind auch die in der Literatur belegten radioprotektiven und chemoprotektiven, durch Chlorella –Applikation zu erzielenden Wirkungen höchst interessant.

Eine gesteigerte Resistenz gegenüber der Einwirkung ionisierender Strahlung läßt sich wiederum über die Aktivierung der Hämatopoese durch **CVB / CVE** – Applikation erklären. Die beobachtete Strahlenresistenz resultiert aus einer gesteigerten Proliferation sowie einer Zunahme der Anzahl von CFU's („colony-forming units“) in Knochenmark und Milz, einer Steigerung der Anzahl von GM-CFC („granulocyte-macrophage colony-forming cells“) im Knochenmark sowie einer gesteigerten CSA („colony-stimulating activity“) im Blutserum. Die Erholung des CFU– und GM-CFC – Pools im Knochenmark nach der Bestrahlung erfolgt in den **CVE / CVB** – behandelten Gruppen schneller als in den Kontrollgruppen^{[35] [36] [37] [38]}.

Das chemoprotektive Potential wird z. B. bei der Inhibition von 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen – induzierter Papillomagenese der Haut durch topische **CVB**–Anwendung deutlich. Die Geschwulstbildung wird gehemmt, das durchschnittliche Tumorgewicht ist verringert und die kumulative Anzahl der Tumore sinkt signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Gleichzeitig steigt das Niveau von Sulfhydryl- und Glutathion–S–Transferase in Leber- und Hautgewebe. Das gesteigerte Glutathion–Transferase Niveau in den Leberzellen läßt sich auch in fetalem bzw. neonatalem Gewebe nachweisen, wenn die Muttertiere entsprechend mit **CVB** gefüttert werden^{[39] [40]}.

Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß bei oraler Anwendung von **CVB** durchaus auch die nachgewiesenen antigentoxische Wirkung von Chlorophyll^{[41] [42]} sowie dessen entzündungshemmende Eigenschaften^[43] bei der Interpretation der Ergebnisse mit in Betracht zu ziehen sind, zumal dieser Wirkstoff auf Grund der durch die Chlorella vorgegebene Zellgröße im Mikrometerbereich in feinstverteilter und damit sehr gut verfügbarer Form vorliegt.

Die bisher geschilderten Wirkungen ergeben ein interessantes und erfolgversprechendes Potential für den Einsatz von **CVB** bzw. **CVE** bei Prävention

und Therapie maligner Tumore, sowohl bei der begleitenden Anwendung bei Chemo- und Strahlentherapie, als auch in der Nachsorge.

In einer klinischen Studie von MARCHANT et al. ^[44] konnte an einer Gruppe von Patienten mit malignen Gliomen gezeigt werden, daß deren durch Chemotherapeutika und Bestrahlung sowie Medikation von Anticonvulsantien und Corticosteroiden schwer gestörten körpereigenen Abwehrkräfte durch orale Applikation von täglich 20 Gramm **CVB** auf nahezu normalem Niveau stabilisierbar sind, ohne die therapeutische Wirkung der eingesetzten Medikamente zu beeinflussen.

C) Chlorella vulgaris - ein natürlicher Helfer bei der Behandlung von Herz – Kreislaufkrankungen ?

In einer Reihe von empirischen Untersuchungen wurde der Nachweis erbracht, daß durch Chlorella vulgaris – Anwendungen Blutdruck, Cholesterinstoffwechsel und Arteriosklerose im positiven Sinne beeinflußt werden können. Als Ursache für diese Effekte dürfte neben den ernährungsphysiologischen Eigenschaften wiederum eine direkte Wechselwirkung mit verschiedenen Inhaltsstoffen (z. B. diverse ungesättigte Fettsäuren sowie Chlorophyll) verantwortlich sein.

OKAMOTO et al. konnten in einer Studie an Ratten nachweisen, daß eine Stunde nach intravenöser Injektion von **CVE** eine signifikante Minderung des Blutdrucks einsetzte. Bei hypertensiven Ratten wurde eine Senkung um 63 mm Hg erreicht, bei Ratten mit normalen Werten fiel der Blutdruck um durchschnittlich 32 mm Hg ^[45].

MURAKAMI konnte in einer analogen Studie an spontan hypertensiven Ratten nach Verabreichung von **CVB** unter Beobachtung vergleichbarer Effekte ein Absinken des Reninspiegels feststellen ^[46].

Die antilipidemische sowie antiarteriosklerotische Wirkung von **CVB** auf mit cholesterinreicher Diät gefütterte Kaninchen wurde von SANO et al. ^[47] untersucht. Die Tiere der mit 1 % **CVB** – Anteil gefütterten Versuchsgruppe wiesen einen signifikant niedrigeren Anstieg sowohl des β -Lipoproteincholesterols, als auch des Gesamtcholesterols auf. Als positive Kontrolle verabreichtes Chlofibrat (Lipidsenker) zeigte keine Wirkung.

Ein analoger Effekt wurde von SANO et al. bei der Applikation von **CVE** an alimentär hyperlipide Ratten beobachtet. Parallel konnte eine gesteigerte fäkale Exkretion von Cholesterin und dessen Derivaten beobachtet werden ^[48].

MARCHANT et al. ^[59] belegen an Hand einer klinischen Studie mit ca. 60 von leichter bzw. mittlerer Hypertonie betroffener Patienten, daß durch Gabe von **CVB** (10g / Tag und Person) in der überwiegenden Mehrzahl der betrachteten Fälle eine Normalisierung des Blutdruckes eintritt (Den Versuchspersonen wurden im Rahmen der Studie die ansonsten applizierten blutdrucksenkenden Mittel mit Einwilligung entzogen)

D) Chlorella vulgaris – ein risikoloses Mittel zur Beschleunigung der Exkretion von Umweltgiften ?

Die in der Chlorella vulgaris vorliegende mehrschichtige Zellwand, besitzt stark adsorbierende Eigenschaften gegenüber Xenobiotika, so daß ein grundlegendes Potential zur Aufnahme sowohl affiner organischer Schadstoffe als auch diverser Schwermetalle vorliegt. Auch ist die Fähigkeit des Chlorinkörpers des Chlorophylls

zur Komplexierung einer Reihe von Metallen in diesem Zusammenhang von Bedeutung.

Obwohl in der populärwissenschaftlichen Literatur häufig über die Nutzung der Chlorella speziell zur Quecksilberausscheidung berichtet wird, konnte in der medizinischen Fachliteratur kein Exaktversuch dazu gefunden werden. Es existieren allerdings eine Vielzahl von Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Umweltechnik, die die extreme Fähigkeit der Chlorella zur Adsorption toxischer Metalle (z. B. Quecksilber und Cadmium) belegen und den Einsatz derartiger Biomasse zur Gewässerreinigung beschreiben ^{[49][50][51]}.

Dementsprechend könnte eine vergleichbare Adsorption auch im Magen-Darmtrakt stattfinden, wobei die Metallexkretion vorwiegend über den Stuhl erfolgen sollte.

Am Beispiel des Cadmiums konnte diese Vermutung bestätigt werden. HAGINO et al. ^[52] berichten über eine 3- bis 7-fache Beschleunigung sowohl der fäkalen als auch der renalen Cadmiumausscheidung durch regelmäßige **CVB** – Gabe bei der Behandlung der Itai- Itai- Krankheit.

Über eine Beschleunigung der fäkalen Exkretion von Dioxin aus mit diesem gefütterten Ratten durch einen Zusatz von 10 % **CVB** zum Futter berichten MORITA et al. ^[53]. PORE et al. ^[54] erzielten einen vergleichbaren Effekt an Chlordeconkontaminierten Ratten.

E) Chlorella vulgaris - Prävention von Mangelerkrankungen?

Auf Grund der ausgewogenen ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Chlorella vulgaris und deren hohen biologischen Wertigkeit sind selbst bei ausschließlichem Verzehr Mangelerkrankungen ausgeschlossen. Die bei der Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel in den üblichen Dosen von ca. 3 g / Tag dem menschlichen Körper über die Chlorella zugeführte Menge an Eiweißen und ungesättigten Fettsäuren kann potentielle Defizite an limitierenden Komponenten in diesem Bereich nur partiell decken. Ähnliches gilt auch für das vorliegende Vitamin – und Mineralstoffspektrum. Der allerdings wahrscheinliche, durch Chemoprotektion die Karzinogenese hemmende, kollektive Effekt einer kontinuierlichen komplexen Grundversorgung mit Mikronährstoffen wird von MARKTL ^[55] diskutiert.

Eine Ausnahme bildet der hohe Vitamin B₁₂ – Gehalt der Chlorella vulgaris (ca. 2,5 mg/kg). Schon bei Verabreichung der empfohlenen 3 g **CVB** täglich wird der durchschnittliche menschliche Tagesbedarf mehrfach abgedeckt. RAUMA et al. konnten in einer zwei Jahre währenden Studie nachweisen, daß sich strikt veganisch ernährende Versuchspersonen durch orale **CVB** – Aufnahme ausreichend mit Vitamin B₁₂ versorgen können, wobei sich die über die Algen aufgenommene Vitamin B₁₂ – Menge mit derjenigen im Serum korrelieren ließ ^[56].

MATSUURA et al. konnten zeigen, daß durch Eisenmangeldiät anämische Ratten dosisabhängig durch **CVB**- Fütterung genesen ^[57].

Chlorella vulgaris – sichere Produktion in geschlossenen Anlagen, eine Weltneuheit aus Deutschland

Bei Betrachten der zitierten Literatur ist auffallend, daß nahezu alle wissenschaftlichen Untersuchungen zu potentiellen physiologischen Wirkungen aus dem japanischen bzw. südostasiatischen Raum stammen. Die Ursachen dafür sind

neben traditionellen Gründen auch in der schlechten Verfügbarkeit der entsprechenden Biomasse in anderen Regionen zu suchen. In Japan und Taiwan wird Chlorella schon seit ca. 30 Jahren in großen Mengen in offenen Anlagen industriell produziert und zu Ernährungs-, Futter- sowie medizinischen Zwecken genutzt. Eine vergleichbar effiziente offene Produktion ist aus klimatischen Gründen in Europa nicht möglich.

Seit Juni 2000 werden nun auch in Deutschland Chlorella vulgaris – Mikroalgen im industriellen Maßstab, jedoch in einer geschlossenen Anlage, kultiviert. Die erste Produktionsanlage dieser Art ist bei der Ökologische Produkte Altmark GmbH in Klötze, Sachsen-Anhalt, in Betrieb. Die Produktion der Chlorella vulgaris erfolgt nach einem patentrechtlich geschützten und von der Bioprodukte Prof. Steinberg GmbH, Merseburg, lizenzierten Verfahren. Das erstmalig in der Welt in dieser Größenordnung laufende Verfahren benutzt als entscheidende Neuheit aus Glasrohren bestehende, geschlossene Photobioreaktoren. Von diesen Glasrohren sind 500 km in Gestellen angeordnet, die ihrerseits zu zwanzig einzeln betreibbaren Modulen zusammengefaßt sind. Das photoaktive Volumen der Rohrreaktoren beträgt ca. 600 m³, wobei die Kultivationslösung zur Sicherung turbulenter Strömungsverhältnisse mit relativ hoher Geschwindigkeit zirkuliert.

In der Kultivationslösung befindet sich die Stammkultur Chlorella vulgaris. Ihr werden als Nährstoffe Kohlendioxid in Lebensmittelqualität und Nährsalze in hinsichtlich des Wachstumsprozesses optimierten Mengen zugesetzt. Für die Einstellung der optimalen Wachstumstemperatur sorgt die Anordnung der Module in einem Gewächshauskomplex von 1,2 ha Gesamtfläche mit geeigneten Heiz- bzw. Kühlvorrichtungen.

Als Lichtquelle dient ausschließlich das Sonnenlicht, wobei auch noch das diffuse Tageslicht im Winterhalbjahr für ein nennenswertes Wachstum ausreicht. Um eine gegenseitige Beschattung der Mikroalgen zu vermindern und um eine Ablagerung der Mikroalgen an den Glasrohrwänden zu minimieren, werden optimale hydrodynamische Verhältnisse durch die verfahrenstechnische Auslegung der Module und der Glasrohrgestelle eingestellt.

Ist durch Zellwachstum, Zellteilung, erneutes Zellwachstum usw. eine bestimmte Biomassekonzentration in der Kultivationslösung überschritten, wird ein Teil der Kultivationslösung aus einem Modul entnommen und die Biomasse durch Hochleistungszentrifugen abgetrennt. Das klare Zentrifugat wird in die Anlage zum Verdünnen der Kultivationslösung zurückgeführt und die abzentrifugierte, breiige Biomasse in einem Sprühtrockner schonend bis auf eine Restfeuchte von weniger als 5 % getrocknet. Das so erhaltene trockene Chlorella vulgaris Pulver wird automatisch abgefüllt und lichtgeschützt verpackt. Im verpackten Zustand ist die Biomasse im Trocknen mehrere Jahre lagerfähig.

Die Mikroalgenbiomasse aus Deutschland wird mit Erfolg in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. In zahlreichen Bäckereien gehört unter Zusatz von Algenpulver erzeugtes Brot und Gebäck schon zum täglichen Angebot. Unter dem Markennamen „Algomed“ sind Algentabletten, hergestellt aus der in Klötze erzeugten Biomasse, in Apotheken als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich.

Literatur

- [1] *F. Jakob, E. J. Jäger, E. Obermann: Botanik;*
Gustav Fischer Verlag Jena, 4. neu bearbeitete Auflage 1994, S. 239 – 264
- [2] *O. Warburg:*
Biochemische Zeitschrift, 1919, 100, 230
- [3] *E. Kessler, V. A. R. Huss: Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the Chlorella (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the university of texas at austin;*
J. Phycol. 1992, 28, 550
- [4] *E. Keßler: Comparative Physiology, Biochemistry and the taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae);*
Plant. Syst. Evol. 1976, 125, 129.
- [5] *H. Takeda: Classification of Chlorella strains by cell wall sugar composition;*
Phytochemistry, 1988, 27 (12), 3823.
- [6] *M. Gabel: Gutachten über den Proteinwert der Mikroalgen – Biomasse (Chlorella vulgaris) der Firma Ökologische Produkte Altmark GmbH Universität Rostock, Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Agrarökologie, 12 / 2000*
- [7] *H. Komaki, M. Yamashita, Y. Niwa, Y. Tanaka, N. Kamiya, Y. Ando, M. Furuse: The effect of processing of Chlorella vulgaris: K-5 on in vitro and in vivo digestibility in rats;*
Animal Feed Science and Technology, 1998, 70 (4), 363
- [8] *Kashiwa, Y., Tanaka, Y.: Effect of Chlorella on the changes in the body weight and rate of catching cold of the 1966 training fleet crew;*
Reported at the Japan Medical Science Meeting, Nagoya, Japan 1966
- [9] *Kojima, M., Kasajima, T., Imai, S., Kobayashi, M., Dobashi, M., Uemura, T.: A new Chlorella polysaccharide and its accelerating effect on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system;*
Recent Adv. R.E.S. Res. 1973, 13, 101
- 10 *Tanaka K., Koga, T., Konishi, F., Nakamura, M., Mitsuyama, M., Himeno, K., Nomoto, K.: Augmentation of host defense by a unicellular green alga, Chlorella vulgaris, to Escherichia coli infection;*
Infect. Immun. 1986, 53 (2), 267
- 11 *Hasegawa, T., Tanaka, K., Ueno, K., Ueno, S., Okuda, M., Yoshikai, Y., Nomoto, K.: Augmentation of the resistance against Escherichia coli by oral administration of hot water extract of Chlorella vulgaris in rats;*
Int. J. Immunopharmacol. 1989, 11(8), 971
- 12 Mackaness, GB: Resistance to intracellular infection;

- J. Infect. Dis. 1971, 123, 439.
- 13 *Hasegawa, T., Okuda, M., Nomoto, K., Yoshikai, Y.:* Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice;
Immunopharmacol. Immunotoxicol. 1994, 16(2), 191
- 14 *Dantas, DC., Kaneno, R., Queiroz, ML.:* The effect of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells.
Immunopharmacol. Immunotoxicol. 1999, 21(3), 609
- 15 *Dantas, DC., Queiroz, ML.:* Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow pregenerator cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*.
Int. J. Immunopharmacol. 1999, 21(8), 499
- 16 *Konishi, F., Tanaka, K., Kumamoto, S., Hasegawa, T., Okuda, M., Yano, I., Yoshikai, Y., Nomoto, K.:* Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamid –treated mice.
Cancer Immunol. Immunother. 1990; 32(11) 1
- 17 *Hasegawa, T., Yoshikai, Y., Okuda, M., Nomoto, K.:* Accelerated restoration of the leukocyte number and augmented resistance against *Escherichia coli* in cyclophosphamid– treated rats orally administered with a hot water extract of *Chlorella vulgaris*;
Int. J. Immunopharmacol. 1990, 12(8), 883
- 18 *Konishi, F., Mitsuyama, M., Okuda, M., Tanaka, K., Hasegawa, T., Nomoto, K.:* Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression by 5-fluorouracil;
Cancer Immunol. Immunother. 1996, 42, 268
- 19 *Hasegawa, T., Okuda, M., Hiromatsu, K., Nomoto, K., Yoshikai, Y.:* Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM% murine leukemia viruses;
Int. J. Immunopharmacol. 1995, 17(6), 505
- 20 *Hasegawa, T., Kimura, Y., Hiromatsu, K., Kobayashi, N., Yamada, A., Makino, M., Okuda, M., Sano, T., Nomoto, K., Yoshikai, K.:* Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*;
Immunopharmacology 1997, 35(3), 273
- 21 *Hasegawa, T., Ito, K., Ueno, S., Kumamoto, S., Ando, Y., Yamada, A., Nomoto, K., Yaunobu Y.:* Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice;

- Int. J. Immunopharmacol. 1999, 21(5), 311**
- 22 *Ibusuki, K., Minamishima, Y.:* Effect of *Chlorella vulgaris* extracts on murine cytomegalovirus infections;
Nat. Immun. Cell Growth. Regul. 1990, 9(2), 121
- 23 *Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K., Shoyama, Y., Kubo, C., Nomoto, K.:* Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer;
Planta Med. 1997, 63(5), 465
- 24 *Hasegawa, T., Noda K., Kumamamoto S., Ando Y., Yamada A., Yoshikai Y.:* *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress – induced apoptosis in thymocytes of mice;
Int. J. Immunopharmacol. 2000, 22 (11) 877
- 25 *Merchant, R., Carmback, C. A., Wise, Ch. M.:* Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for patients with fibromyalgia syndrome: A pilot study;
Phytotherapy Research 2000, 14, 167
- 26 *Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T., Takido, M.:* Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate – induced inflammation and tumor promotion in mouse skin;
Biol. Pharm. Bull. 1996, 19(4), 573
- 27 *Morimoto, T., Nagatsu, A., Muratami, N., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A.:* Anti-tumor-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*;
Phytochemistry 1995, 40(5), 1433
- 28 *Tanaka, K., Konishi, F., Hemeno, K., Taniguchi, K., Nomoto, K.:* Augmentation of antitumor resistance by strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*;
Cancer Immunol. Immunother. 1984, 17(2), 90
- 29 *Tanaka, K., Tomita, Y., Tsuruta, M., Konishi, F., Okuda, M., Himeno, K., Nomoto, K.:* Oral administration of *Chlorella vulgaris* augments concomitant antitumor immunity;
Immunopharmacol. Immunotoxicol. 1990, 12(2), 277
- 30 *Konishi, F., Tanaka, K., Hiemeno, K., Taniguchi, K., Nomoto, K.:* Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE – induced polymorphonuclear leukocytes;
Cancer Immunol. Immunother. 1985, 19(2), 73
- 31 *Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Kamiya, N., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K., Shoyama, Y.:* A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*;

- Planta Med. 1996, 62(5), 423**
- 32 *Okamoto, M., Kaji, R., Kasetani, H., Yoshida, H., Saito, M., Sato, M.:* Purification and characterisation of interferon-gamma-inducing molecule of OK-432, a penicillin-killed streptococcal preparation, by monoclonal antibody neutralizing interferon-gamma-inducing activity of OK-432;
J. Immunother 1993, 13(4) 232
- 33 *Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., Orita, K.:* Krestin (PSK);
Cancer Treat. Rev. 1984, 11(2), 131
- 34 *Noda, K., Ohno, N., Tanaka, K., Okuda, M., Yadomae, T., Nomoto, K., Shoyama, Y.:* A new type of Biological Response Modifier from *Chlorella vulgaris* which needs protein moiety to show an antitumour activity;
Phytotherapy Research 1998, 12(5) 309
- 34 *Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K. Hasegawa, T., Okuda, M., Shoyama, Y., Nomoto, K.:* A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotentiality;
Cancer Immunol. Immunother. 1998, 45(6), 313
- 35 *Rotkowska, D., Vacek, A., Bartonickova, A.:* The radioprotective aqueous extract from chlorococcal freshwater algae (*Chlorella kessleri*) in mice and rats;
Strahlenther. Onkol. 1989, 165(11), 813
- 36 *Vacek, A., Rotkowska, D., Bartonickova, A.:* Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from chlorococcal algae (Ivastimul) administered to mice before irradiation;
Exp. Hematol. 1990, 18(3), 234
- 37 *Sarma, L., Tiku, AB., Kesavan, PC., Ogaki, M.:* Evaluation of radioprotective action of mutant (E-25) form of *Chlorella vulgaris* in mice;
J. Radiat. Res. 1993, 34(4), 277
- 38 *Singh, SP., Tiku, AB., Kesavan, PC.:* Post-exposure radioprotection by *Chlorella vulgaris* (E-25) in mice;
Indian J. Exp. Boil. 1995, 33(8), 612
- 39 *Singh, A., Singh, SP., Bamezai, R.:* Inhibitory potential of *Chlorella vulgaris*(E-25) on mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxification system;
Anticancer Res. 1999, 19(3A), 1887
- 40 *Singh, A., Singh, SP., Bamezai, R.:* Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation:
Anticancer Res. 1998, 18(3A), 1509

- 41 *Negishi, T., Arimoto, S., Nishizaki, C., Hayatsu, H.:* Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3]indole (Trp-P-2);
Carcinogenesis 1989, 10(1), 145
- 42 *Negishi, T., Rai, H., Hayatsu, H.:* Antigenotoxic activity of natural chlorophylls;
Mutat. Res. 1997, 376(1-2), 97
- 43 *Singh, A., Singh, SP., Bamezai, R.:* Modulatory influence of Chlorophyllin on the mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxification system:
Carcinogenesis 1996, 17(7), 1459
- 44 *Merchant, R., Rice, C., Young, H.:* Dietary *Chlorella pyrenoidosa* for patients with malignant glioma: effects of immuno-competence, quality of life, and survival;
Phytotherapy Research 1990, 4(6) 220
- 45 *Okamoto, K., Iizuka, Y., Murakami, T., Miyake, H., Suzuki, T.:* Effects of chlorella alkali extract on blood pressure in SHR:
Jpn. Heart J. 1978, 19(4), 622
- 46 *Murakami, T.:* Effekt of heterotrophy *Chlorella* on blood pressure and development of apoplexy in hypertensive rats.
Agricultural – Chemical Convention in Sendai, Japan March 30, 1983
- 47 *Sano, T., Tanaka, Y.:* Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits;
Artery 1987, 14(2), 76
- 48 *Sano, T., Kumamoto, Y., Kamiya, N., Okuda, M., Tanaka, Y.:* Effect of lipophilic extract of *chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipide cholesterol-fed rats;
Artery 1988, 15(4), 217
- 49 *Travieso, L., Canizares, RO., Borja, R., Dominguez, AR., Dupeyron, R., Valient, R.:* Heavy metal removal by microalgae ;
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1999, 62(2), 144
- 50 *Chong, AM., Wong, YS., Tam, NF.:* Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater:
Chemosphere 2000, 41(1-2), 251
- 51 *Krihnamurthy, S., Frederick, RM.:* Using biopolymers to remove heavy metals from soil and water;
Govt. Reports Announcements & Index (GRA&I), 1994, 13
- 52 *Hagino, N., Ichimura, S.:* Effect of clorella on fecal and urinary cadmium excretion in "Itai – Itai" disease:

Nippon Eiseigaku Zasshi 1975, 30(1)77

- 53 *Morita, K., Matsueda, T., Iida, T., Hasegawa, T.:* Chlorella accelerates dioxin excretion in rats;
J. Nutr. 1999, 129(9), 1731
- 54 *Pore, RS.:* Detoxification of Chlordecone poisoned rats with chlorella and chlorella derived sporopollenin;
Drug. Chem. Toxicol. 1984, 7(1), 57
- 55 *Marktl, W.:* Micronutrients in cancer prevention;
Forsch. Komplementarmed. 1999, 6(5), 248
- 56 *Rauma, AL., Torronen, R., Hanninen, O., Mykkanen, H.:* Vitamin B₁₂ status of long-term adherents of a strict uncooked vegan diet ("living food diet") is compromised;
J. Nutr. 1995, 125(10), 2511
- 57 *Matsuura, E., Nemoto, T., Hozumi, H., Izumi, K., Sait, Y., Ispida, H., Fukimbara, T., Kawahara, H.:* Effect of chlorella on rats with iron deficient anemia;
Kitasato Arch. Exp. Med. 1991, 64(4), 193
- 58 *Justo, G. Z., Silva, M. R., Queiroz, M. L. S.:* Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice;
Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2001, 23 (1), 119
- 59 Merchant, R. E., Andre C. A.: A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, Hypertension and ulcerative colitis
Alternative Therapies, 2001, 7 (3), 79