

# Vergleichbarkeit von Phytopharmaka am Beispiel Ginkgo biloba- haltiger Produkte des US-amerikanischen Marktes

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von Apothekerin  
Sabine Kreßmann  
aus Frankfurt

Frankfurt 2001

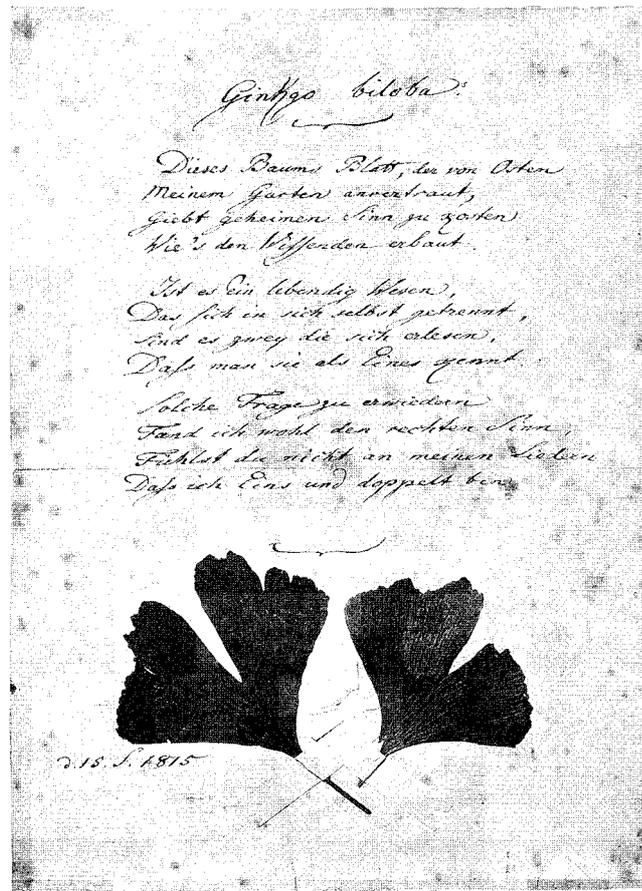
(D F 1)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> (D F 1: D = Dissertation / F 1 = Bibliothekskennzeichen)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Herr Professor Dr. W.E. Müller
Gutachter:	Herr Professor Dr. W.E. Müller Herr Professor Dr. H.H. Blume
Datum der Disputation:	11. März 2002



Goethes Reinschrift des Ginkgo-biloba-Gedichts,  
15. September 1815  
(mit zwei von ihm selbst aufgeklebten Ginkgo-Blättern).

### Ginkgo biloba.

Dieses Baums Blatt, der von Osten  
Meinem Garten anvertraut,  
Giebt geheimen Sinn zu kosten  
Wie's den Wissenden erbaut.

Ist es Ein lebendig Wesen,  
Das sich in sich selbst getrennt,  
Sind es zwey die sich erlesen,  
Daß man sie als Eines kennt.

Solche Frage zu erwiedern  
Fand ich wohl den rechten Sinn,  
Fühlst du nicht an meinen Liedern  
Daß ich Eins und doppelt bin.

Übertragung des o.a. Goethe-  
Gedichtes in Druckschrift

## Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
A $\beta$	Beta-Amyloid Peptid
ACTH	AdrenoCorticoTropes Hormon
AESGP	Association Européenne des Spécialités Pharmaceutiques Grand Public (Europäischer Fachverband der Arzneimittel-Hersteller)
AMG	Arzneimittelgesetz
ANOVA	Analysis of Variances
AUC	Area Under the Curve
AUC <sub>tot</sub> = AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub>	Gesamt-AUC (von t = 0 bis t = $\infty$ )
Bax	Protein der Bcl-2-Familie, welches Apoptose initiiert
Bcl-2	mitochondriales, integrales Membranprotein, das Apoptose zu inhibieren vermag
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BGA	Bundesgesundheitsamt
BSTFA	N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
c <sub>max</sub>	maximaler (Plasma)konzentrationspiegel
c-Myc	Onkoprotein
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
COX	Cyclooxygenase
CPMP	Committee for proprietary medicinal products
CV	Coefficient of Variation
DAB	Deutsches Arzneibuch
DEV	Drogen-Extrakt-Verhältnis
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DSHEA	Dietary Supplement Health and Education Act
EGb 761	Extractum Ginkgo bilobae 761
EUAB	Europäisches Arzneibuch
eV	Elektronenvolt

FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
FDA	Food and Drug Administration
g	Gravitation
GABA	Gamma-Amino-Butyric-Acid
GC	Gaschromatographie
Geo.-Mittel	Geometrisches Mittel
GkA	Ginkgolid A
GkB	Ginkgolid B
5-HT	5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)
HCl	Salzsäure
HMP	Herbal Medicinal Products
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigchromatographie)
ICH	International Conference on Harmonization
IL-2	Interleukin-2 (von Leukozyten sezernierte Kommunikationsproteine der Immunregulation)
IND	Investigational New Drug
IU	International Unit
KG	Körper-Gewicht
KPa	Kilopascal
LDL	Low Density Lipoprotein
LLQ	Lower Limit of Quantitation (Bestimmungsgrenze)
MAO	Mono-Amin-Oxidase
M <sub>R</sub>	Relatives Molekulargewicht
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazoliumbromid
m/z	Massen-Ladungsverhältnis
n	Anzahl
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NDA	New Drug Application
NGF	Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NO	Stickstoffmonoxid
OTC	Over The Counter
PAF	Plättchen-Aggregations-Faktor
p 53	nukleäres, proapoptotisches Phosphoprotein des Tumorsuppressorgens (Transkriptionsfaktor)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBML	Peripheral Blood Mononuclear Lymphocytes
PC	Phaeochromocytoma Cells
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidium-Iodid
PKC	Protein-Kinase C
ppm	parts per million
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid
QC	Quality Control (Qualitätskontrollprobe)
R	Referenz-Produkt
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPM	Rounds Per Minute
RSD	Relative Standard Deviation (relative Standardabweichung)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
T	Test-Produkt
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{max}$	Zeitpunkt der maximalen (Plasma)konzentration
TNF	Tumornekrosefaktor
$t_R$	Retentionszeit
U/min.	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopoe
UV	Ultraviolett
VT	Volumenteile
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	1
1.2	DER BEGRIFF PHYTOPHARMAKA IN DEUTSCHLAND	2
1.3	CHARAKTERISTIKA UND BESONDERHEITEN VON PHYTOPHARMAKA	3
1.4	KLASSIFIZIERUNG PFLANZLICHER ARZNEIMITTEL IN DEN USA	4
1.4.1	DER STATUS PFLANZLICHER ZUBEREITUNGEN ALS NAHRUNGSERGÄNZUNGSMITTEL	4
1.4.2	DER STATUS PFLANZLICHER ZUBEREITUNGEN ALS OTC-ARZNEIMITTEL (OTC, OVER THE COUNTER)	6
1.4.3	DER HOMÖOPATHIKA-STATUS PFLANZLICHER ZUBEREITUNGEN	8
1.4.4	PFLANZLICHE ZUBEREITUNGEN ALS FUNCTIONAL FOODS	8
1.4.5	KOMBINATIONSPRODUKTE EINSCHLIEßLICH KOMBINATIONEN MIT HOMÖOPATHIKA, NAHRUNGSERGÄNZUNGSMITTELN, VITAMINEN UND AMINOSÄUREN	8
1.5	MEIST VERKAUFTE PFLANZLICHE PRODUKTE IN DEN USA	9
1.6	BEDEUTUNG VON GINKGO BILOBA	10
1.7	INHALTSSTOFFE VON GINKGO BILOBA-BLÄTTERN UND -EXTRAKT	11
1.8	GINKGO BILOBA – PHARMAKOLOGIE	12
1.8.1	EXPERIMENTELLE BEFUNDE	13
1.8.2	KLINISCHE STUDIEN	31
1.9	TOXIZITÄT UND SICHERHEIT VON EGB 761 ENTHALTENDEN PRÄPARATEN	35
1.10	PHARMAKOKINETIK IM MENSCHEN	35
1.11	VORSTELLUNG EINES <i>IN VITRO</i> -MODELLS IM SINNE EINES GEEIGNETEN SURROGATPARAMETERS FÜR DIE WIRKSAMKEIT DES GINKGO-EXTRAKTES	36
1.11.1	DEFINITION DER APOPTOSE	36
1.11.2	APOPTOSE UND OXIDATIVER STREß	38
1.11.3	ANTIAPOPTOTISCHE / ANTIOXIDATIVE EIGENSCHAFTEN DES EGB 761	39
<b>2</b>	<b><u>MATERIALIEN UND METHODEN</u></b>	<b>41</b>
2.1	MATERIALIEN	41
2.1.1	VERGLEICH DER PHARMAZEUTISCHEN QUALITÄT GINKGO BILOBA-HALTIGER FERTIGPRÄPARATE	41
2.1.2	<i>IN VITRO</i> -VERSUCHE AN VERSCHIEDENEN ZELLKULTURSYSTEMEN	45
2.1.3	BIOVERFÜGBARKEITSTUDIE ZWEIER AMERIKANISCHER GINKGO BILOBA-PRÄPARATE	48
2.2	METHODEN	49
2.2.1	VERGLEICH DER PHARMAZEUTISCHEN QUALITÄT GINKGO BILOBA-HALTIGER FERTIGPRÄPARATE	49

---

2.2.2	<i>IN VITRO</i> -VERSUCHE AN VERSCHIEDENEN ZELLKULTURSYSTEMEN	61
2.2.3	BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE ZWEIER AMERIKANISCHER GINKGO BILOBA-PRÄPARATE	76
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>84</b>
<b>3.1</b>	<b>VERGLEICH DER PHARMAZEUTISCHEN QUALITÄT AMERIKANISCHER GINKGO BILOBA-HALTIGER FERTIGPRÄPARATE</b>	<b>84</b>
3.1.1	GLEICHFÖRMIGKEIT EINZELDOSIERTER ARZNEIFORMEN	84
3.1.2	FREISETZUNGSVERHALTEN AUSGEWÄHLTER GINKGO-PRÄPARATE DES AMERIKANISCHEN MARKTES	104
<b>3.2</b>	<b>VERGLEICH VON DOSIERUNGSEMPFEHLUNGEN</b>	<b>108</b>
<b>3.3</b>	<b><i>IN VITRO</i>-VERSUCHE AN VERSCHIEDENEN ZELLKULTURSYSTEMEN</b>	<b>111</b>
3.3.1	APOPTOSE-VERSUCHE AN JURKAT-ZELLEN	111
3.3.2	APOPTOSE-VERSUCHE AN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN (PBMC)	122
3.3.3	MTT-VERSUCHE AN PC-12-ZELLEN	132
3.3.4	MTT-VERSUCHE AN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN (PBMC)	143
<b>3.4</b>	<b>VERGLEICHENDE BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE ZWEIER GINKGO BILOBA-HALTIGER FERTIGPRÄPARATE</b>	<b>144</b>
3.4.1	VORSTUDIENVALIDIERUNG	144
3.4.2	VALIDIERUNG WÄHREND DER ROUTINE-ANALYSE	145
3.4.3	STUDIENERGEBNISSE	146
3.4.4	STUDIENAUSWERTUNG	155
<b>3.5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG WICHTIGER ERGEBNISSE DES TEST- UND REFERENZPRODUKTES DER BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE</b>	<b>157</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>160</b>
<b>4.1</b>	<b>KRITERIEN ZUR VERGLEICHBARKEIT VON PHYTOPHARMAKA</b>	<b>161</b>
4.1.1	<i>IN VITRO</i> -FREISETZUNG VON PHYTOPHARMAKA	163
4.1.2	BIOVERFÜGBARKEITSUNTERSUCHUNGEN AN PHYTOPHARMAKA	164
4.1.3	ALTERNATIVEN DER PLASMAKONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT VON PHYTOPHARMAKA	165
4.1.4	BIOPHARMAZEUTISCHE KLASSIFIZIERUNG	167
<b>4.2</b>	<b>BEWERTUNG DER QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN PRODUKTUNTERSCHIEDE HINSICHTLICH DER KRITERIEN FÜR VERGLEICHBARKEIT VON PHYTOPHARMAKA</b>	<b>170</b>
4.2.1	PHARMAZEUTISCHE QUALITÄT	170
4.2.2	BEWERTUNG DER ERGEBNISSE IN HINBLICK AUF EINEN PHARMAKODYNAMISCHEN ANSATZ	173

---

4.2.3	BEWERTUNG DER <i>IN VITRO</i> -FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN (BIOPHARMAZEUTISCHE QUALITÄT) UND DER <i>IN VIVO</i> -BIOVERFÜGBARKEITSSTUDIE	188
4.2.4	BEWERTUNG HINSICHTLICH DES BCS-SYSTEMS: EINFLUß DER ARZNEIFORM DER UNTERSUCHTEN GINKGO BILOBA PRÄPARATE AUF DIE BIOVERFÜGBARKEIT	189
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>190</b>

---

**LITERATURVERZEICHNIS****PUBLIKATIONEN****DANKSAGUNG****LEBENS LAUF**

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, exemplarisch am Beispiel von Ginkgo biloba-Extrakt enthaltenden Präparaten die Problematik der Vergleichbarkeit und Austauschbarkeit von Phytopharmaka aufzuzeigen. Dazu wurden – im Sinne rationaler Phytotherapie – die zur Verfügung stehenden US-amerikanischen Präparate auf einige (bio)pharmazeutische Kriterien überprüft: Gleichförmigkeit der Masse, Gehalt an relevanten Inhaltsstoffen, Dosiergenauigkeit, *in vitro*-Freisetzung und Bioverfügbarkeit/Bioäquivalenz. Hinsichtlich des Gehaltes relevanter Inhaltsstoffe wurden maßgeblich die Kriterien der Kommission E-Monographie zugrunde gelegt, die in den USA zwar keine Gültigkeit besitzen, jedoch wissenschaftlich akzeptiert sind, und auf die in Angaben auf Verpackungen auch in den USA hinsichtlich Indikation und Gehalt häufig Bezug genommen wird. Des Weiteren sollten geeignete Kriterien für den Vergleich und zur Austauschbarkeit von Phytopharmaka erarbeitet werden. Prinzipiell ist es schwierig, Phytopharmaka über Leitsubstanzen, die evtl. nicht oder nur zum Teil zur Wirksamkeit beitragen, zu vergleichen. Deshalb sollte nach einem pharmakodynamischen Ansatz (Bioassay) gesucht werden, dessen Effekte graduell quantifizierbar sind und entweder mit der klinischen Wirksamkeit des Arzneimittels oder mit einem im Plasma enthaltenen Inhaltsstoff korrelieren.

Angesichts der Fülle der Präparate, der zunehmenden Marktbedeutung und der Anwendung bei definierten Indikationen stellt sich die Frage, ob eine angemessene Qualität der Produkte deren Einsatz rechtfertigt. Außerdem werden Forderungen laut, den Phytopharmaka-Markt im Sinne der Vergleichbarkeit transparenter und damit patientenorientierter zu gestalten. Um zu verdeutlichen, welche gesetzlichen Anforderungen an US-amerikanische Phytopharmaka hinsichtlich Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zu stellen sind, werden zunächst die gesetzlichen Rahmenbedingungen für pflanzliche Zubereitungen skizziert.

Auf der Suche nach einem geeigneten pharmakodynamischen Ansatz erschien es sinnvoll, sich einen Überblick darüber zu verschaffen,

1. welche pharmakologischen Eigenschaften Ginkgo biloba bzw. einzelne Inhaltsstoffe prinzipiell besitzen,

2. welche Effekte *in vivo* ausgelöst werden können,
3. an welchen *in vitro*- Modellen die Effekte gezeigt werden können,
4. welche pharmakologischen Eigenschaften in bezug auf die in der Kommission E-Monographie angeführten Indikationen relevant sind und
5. ob bereits etablierte pharmakodynamische Ansätze (Bioassays) für Ginkgo biloba in der Literatur beschrieben sind.

Deshalb werden im folgenden

1. die Klassifizierung US-amerikanischer Phytopharmaka nach den dort gültigen gesetzlichen Rahmenbedingungen vorgenommen,
2. die pharmakologischen Aspekte von Ginkgo biloba nach aktuellem Kenntnisstand dargestellt und
3. ein Ansatz für ein *in vitro*-Modell entwickelt, welches möglicherweise als pharmakodynamischer Versuchsansatz dienen könnte.

## 1.2 Der Begriff Phytopharmaka in Deutschland

Im Arzneimittelgesetz von 1976 (§ 3 Abs. 2 AMG II) sind Phytopharmaka definiert als Stoffe aus „Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenbestandteilen in bearbeitetem oder unbearbeitetem Zustand“. Phytopharmaka, im angelsächsischen Sprachgebrauch Herbal Medicinal Products (HMP) genannt, sind wesentlicher Teil des heutigen Arzneimittelangebots. Sie unterliegen wie alle Arzneimittel der Zulassungspflicht, d. h. prinzipiell dem Nachweis der Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit.

Für Phytopharmaka galt bisher (vorgesehen war bis 1990, letztendlich bis zur 10. AMG-Novelle) eine Übergangsregelung, in der durch den § 22 Absatz 3 auf den Beleg der Wirksamkeit (klinische Prüfungen) und den Beleg der Unbedenklichkeit (pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen) verzichtet wurde, sofern anderes wissenschaftliches Erkenntnismaterial vorgelegt wurde.

Das BfArM (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte), ehemals BGA (Bundesgesundheitsamt), hatte eine unabhängige Expertenkommission (Kommission E) mit der Aufgabe, alles wissenschaftliche Erkenntnismaterial relevanter pflanzlicher Produkte auf dem deutschen Markt in Form von Monographien aufzuarbeiten, gegründet. Die aus dieser

---

Arbeit (bis 1994) resultierenden Monographien stellten daher die Grundlage für die Zulassung und die sogenannte Nachzulassung in Deutschland dar.

Im Zuge der 10. AMG-Novelle, durch die das Verfahren der Nachzulassung und die Anpassung an die Forderungen der Europäischen Union hinsichtlich des Nachweises der Qualität, Unbedenklichkeit und Wirksamkeit beschleunigt werden sollte, werden Phytopharmaka-Hersteller dazu verpflichtet, Ergebnisse zu präklinischen und klinischen Studien bzw. bibliographische Unterlagen / Sachverständigengutachten oder eine Bezugnahme auf ein in Deutschland oder in der Europäischen Union zugelassenes Arzneimittel vorzulegen. Mittel ohne Wirksamkeitsbeleg können gegebenenfalls als „traditionell“ angewendetes Arzneimittel nach § 109a AMG zugelassen werden. In der Nachzulassung befindliche Arzneimittel sind entsprechend zu kennzeichnen.

### **1.3 Charakteristika und Besonderheiten von Phytopharmaka**

Pflanzliche Arzneimittel sind zumeist Zubereitungen (Extrakte) aus Drogen und damit komplex zusammengesetzte Vielstoffgemische, die gemäß AMG in ihrer Gesamtheit einen Wirkstoff darstellen. Pflanzliche Zubereitungen können aber auch die Droge als Ganzes enthalten.

Extrakte werden unter anderem durch folgende Merkmale charakterisiert:

1. Ausgangsdroge
2. Art und Konzentration des Auszugsmittels / DEV (natives Droge-/Extrakt-Verhältnis)
3. Art des Herstellungsverfahrens
4. Physikalischer Zustand der pflanzlichen Zubereitung

Die natürliche Herkunft bedingt aufgrund variierender exogener Faktoren wie Standort, Bodenbeschaffenheit, Klima, Erntezeitpunkt usw. eine in Grenzen variierende Zusammensetzung der extrahierbaren Bestandteile. Daraus resultieren zwangsläufig Extrakte variierender Zusammensetzung, auch dann, wenn die Extrakte nach hochgradig standardisierten Verfahren hergestellt werden.

---

In den seltensten Fällen sind einzelne wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe einer pflanzlichen Droge bekannt, so daß eine Normierung auf eine solche wirksamkeitsbestimmende Substanz im allgemeinen nicht möglich ist. Für die meisten pflanzlichen Extrakte erscheint es nicht sinnvoll – wenn nicht gar unmöglich – nach wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen zu suchen. Hier lassen sich bestenfalls mehrere wirksamkeitsmitbestimmende Komponenten identifizieren, die gemeinsam das therapeutische Potential des Extraktes konstituieren (Dingermann, 1999).

## **1.4 Klassifizierung pflanzlicher Arzneimittel in den USA**

Pflanzliche Produkte können prinzipiell als Lebensmittel (zum Beispiel Früchte, Gemüse, Tees, Gewürze oder Aromen), als Nahrungsergänzungsmittel (eine Untergruppe der Lebensmittel), als Arzneimittel oder Kosmetika je nach ihrem Bestimmungszweck eingeordnet werden.

Die in diesem Absatz verwendeten Definitionen bzw. Informationen stammen aus den Werken „The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide To Herbal Medicines“ (1998) und „Pflanzliche Arzneimittel in der Europäischen Union“ (1998).

### **1.4.1 Der Status pflanzlicher Zubereitungen als Nahrungsergänzungsmittel**

Der Status als Nahrungsergänzungsmittel (die rechtlich der Gruppe der Lebensmittel zugeordnet werden) ist bei weitem der von den Herstellern pflanzlicher Produkte heute am häufigsten gewählte, da keine Zulassung vor dem Inverkehrbringen erforderlich ist. Die Definition des Begriffes Nahrungsergänzungsmittel (dietary supplement) wurde im § 3 des Nahrungsergänzungsmittelgesetzes (Dietary Supplement Health and Education Act 1994, DSHEA) festgelegt, der den § 3 des Gesetzes über Lebensmittel, Arzneimittel und Kosmetika (Federal Food, Drug and Cosmetic Act, FDC Act) mit 21 U.S.C. 321 (ff) änderte. Nahrungsergänzungsmittel umfassen Produkte, die zur Ergänzung der Ernährung bestimmt sind. Sie enthalten ein Vitamin, einen Mineralstoff, eine Pflanze oder andere Stoffe pflanzlichen Ursprungs; eine Aminosäure, einen Nahrungsinhaltsstoff zur Anwendung beim Menschen, um die Nahrung durch Erhöhung der gesamten Aufnahme zu ergänzen; oder ein Konzentrat, einen Metaboliten, einen Extrakt oder eine Kombination von diesen Bestandteilen. Nahrungsergänzungsmittel müssen als solche gekennzeichnet sein und

---

enthalten weder Tabak noch Lebensmittelprodukte, die als konventionelle Lebensmittel auf den Markt gebracht werden, oder Produkte, die als alleiniger Bestandteil einer Mahlzeit vertreten sind. Anzumerken ist jedoch, daß ein Nahrungsergänzungsmittel in Form eines konventionellen Lebensmittels verkauft werden kann. So kann z. B. ein pflanzlicher Tee entweder ein konventionelles Lebensmittel oder ein Nahrungsergänzungsmittel sein, jeweils abhängig von der beabsichtigten Verwendung des Tees.

Die Kategorie pflanzlicher Arzneimittel „ohne zugelassene therapeutische Indikationen“ entspricht der der Nahrungsergänzungsmittel, die per Gesetz als Lebensmittel (food) eingestuft werden. Krankheitsbezogene Aussagen, ausdrücklich oder mitenthaltend, sind für Nahrungsergänzungsmittel nicht erlaubt. Unter dem FDC Act wird ein Produkt, das zur Diagnose, zur Behandlung, Heilung, Linderung oder Vorbeugung einer Krankheit bestimmt ist, als Arzneimittel angesehen.

Der FDC Act von 1938 mit seinen nachfolgenden Ergänzungen regelt das Inverkehrbringen und den Verkauf von Lebensmitteln, Arzneimitteln und Kosmetika in den Vereinigten Staaten. Die amerikanische Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) ist in erster Linie verantwortlich für die Interpretation und Umsetzung dieses Gesetzes.

Das Nahrungsergänzungsmittelgesetz (DSHEA) erlaubt Aussagen zur Unterstützung der Ernährung bei der Kennzeichnung von Nahrungsergänzungsmitteln, die das allgemeine Wohlbefinden oder die beabsichtigte Wirkung auf die Struktur oder Funktion des menschlichen Körpers beschreiben. Diese Aussagen sind allgemein als structure/function claims bekannt. Wegen des fehlenden Patentschutzes und dem sich daraus ergebenden Mangel geschützter Forschung mit pflanzlichen Produkten beruhen structure/function claims zumeist auf öffentlich zugänglicher Forschung, die in anderen Ländern durchgeführt worden ist, oder auf einer Vorgeschichte der Anwendung. Außerdem sind Gefahrenhinweise, mögliche Nebeneffekte (potential side effects), Kontraindikationen (contraindications appropriate for some users) und spezielle Warnungen (if needed, additional special warnings) erlaubt.

Ein Einverständnis oder eine Erlaubnis der FDA sind für structure/function claims nicht erforderlich. Der Hersteller muß jedoch die FDA von einem structure/function claim innerhalb der ersten 30 Tage nach Inverkehrbringen seines Produktes benachrichtigen. Der structure/function claim muß wahrheitsgemäß und darf nicht irreführend sein und muß auf

---

wissenschaftlichen Belegen beruhen, die zur Zeit der Beanspruchung der Aussage in den begründeten Akten des Herstellers enthalten sind. Anders als structure/function claims benötigen gesundheitsbezogene Aussagen (health claims) eine FDA-Genehmigung vor dem Inverkehrbringen.

#### **1.4.2 Der Status pflanzlicher Zubereitungen als OTC-Arzneimittel (OTC, Over The Counter)**

Der Status als OTC-Arzneimittel verlangt, daß die Produkte entsprechend der Bundesgesetze „allgemein als sicher und wirksam anerkannt sind“ („generally recognised as safe and effective“, GRASE). Die Unbedenklichkeit kann in einigen Fällen durch publizierte Studien belegt sein, jedoch können auch akute und chronische Toxizitätsstudien am Tier verlangt werden. Der Nachweis der Wirksamkeit erfordert generell doppelblinde plazebokontrollierte klinische Studien am Menschen, um dem Erfordernis angemessener und kontrollierter Studien zu entsprechen.

Der FDC Act von 1938 forderte für neue Arzneimittel den Nachweis der Unbedenklichkeit und die Vorlage eines neuen Zulassungsantrages (New Drug Application, NDA). Im Jahr 1962 wurde das FDC Act geändert, um auch das Erfordernis des Wirksamkeitsnachweises für neue Arzneimittel einzuschließen. Die amerikanische Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA), die für die Interpretation und Umsetzung des FDC Acts in erster Linie verantwortlich ist, führte darauf eine Überprüfung aller Arzneimittel durch, einschließlich der 400 OTC-Arzneimittel, die zwischen 1938 und 1962 allein auf der Basis von Unbedenklichkeitsdaten für das Inverkehrbringen zugelassen worden waren. Im Jahr 1972 richtete die FDA das OTC-Arzneimittel-Monographiesystem ein und begann mit der Wirksamkeits- und Unbedenklichkeitsüberprüfung aller OTC-Arzneimittel, die nicht von einer Neuzulassung erfaßt waren oder vor 1962 allein auf der Basis von Unbedenklichkeitsdaten zugelassen worden waren. Seit 1972 werden OTC-Monographien nach Arzneimittel-Klassen, eingeteilt nach ihrer therapeutischen Wirkung, publiziert, wobei eine allgemein als wirksam und unbedenklich angesehene Dosis für wirksame Bestandteile festgesetzt wird.

Pflanzliche Produkte, die im OTC-Arzneimittel-Überprüfungsverfahren nicht als Altarzneimittel eingestuft wurden (grandfathered) und zur therapeutischen Anwendung

bestimmt waren, benötigten eine Zulassung durch die FDA im Rahmen eines neuen Zulassungsantrages (NDA). In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind einige der über 50 pflanzlichen Arzneidroge bzw. Arzneidroge-Mischungen, die als Investigational New Drugs/New Drug Applications (INDs/NDAs) vorläufig zugelassen sind, aufgeführt.

**Tab. 1:** INDs/NDAs [Quelle: Leaders, 1998]

<b>Dt. Bezeichnung</b>	<b>Arzneidroge</b>	<b>Indikation</b>
Ginkgo	Ginkgo biloba (Blätter, Scheinfrüchte)	Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit
Grüner Tee	Camellia sinensis (Blätter)	Krebs
Sägepalme	Serenoa repens (Früchte)	Benigne Prostatahyperplasie
Johanniskraut	Hypericum perforatum (Kraut)	Depressionen

Ein Stoff wird nicht als neuer Arzneistoff angesehen, wenn er GRASE-Status hat und zusätzlich in erheblichem Umfang (material extent) und für eine erhebliche Zeit (material time) in den Verkehr gebracht worden ist (§ 201 (p) (21 U.S.C. 321 (p)). Derzeit gründet die FDA „erheblichen Umfang“ und „erhebliche Zeit“ auf die Markterfahrung in den Vereinigten Staaten, obgleich die Einbeziehung von Markterfahrung in anderen Ländern in Diskussion ist.

Da beträchtliche Forschung für die Erteilung des OTC-Status erforderlich ist, ergibt sich die Frage des Patentschutzes. Pflanzliche Produkte sind im allgemeinen natürliche oder generische Produkte ohne große Innovationen für den Menschen; deshalb ist es schwierig bzw. unmöglich, für sie Patente zu erhalten. Ohne Patentschutz haben die Hersteller jedoch keinen Ansporn zur Durchführung umfangreicher Forschungen mit ihren pflanzlichen Produkten, denn die Ergebnisse würden auch ihren Mitbewerbern zur Verfügung stehen. Außerdem können pflanzliche Produkte auch ohne Forschungsinvestitionen als Nahrungsergänzungsmittel vermarktet werden.

Von den pflanzlichen Bestandteilen, die in der OTC-Arzneimittel-Überprüfung enthalten waren, wurden sechs als wirksam und unbedenklich für ihre beabsichtigten Anwendungen aufgelistet (z.B. amerikanische Faulbaumrinde, Sennesblätter und Flohsamen als Laxantien), und mehr als 150 wurden aus dem Überprüfungsverfahren ausgeschlossen oder als unwirksam, risikobehaftet oder ohne ausreichenden Beleg zur Wirkung bewertet. Einige

---

dieser zuvor als wirksam und unbedenklich für ihre beabsichtigte OTC-Anwendung zugelassenen sechs pflanzlichen Produkte sind seitdem in die Kategorie „weitere Daten erforderlich“ übergewechselt (z B. amerikanische Faulbaumrinde, Sennes und Aloe).

### **1.4.3 Der Homöopathika-Status pflanzlicher Zubereitungen**

Unter dem FDC-Act werden Zubereitungen, die im Homöopathischen Arzneibuch der Vereinigten Staaten (Homeopathic Pharmacopeia of the United States) gelistet sind, per Gesetz als Arzneimittel definiert. Arzneimittel jedoch, die im Homöopathischen Arzneibuch der Vereinigten Staaten gelistet sind, sind von der Überprüfung von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit durch die FDA vor dem Inverkehrbringen ausgenommen. Als der FDC Act im Jahr 1938 in Kraft trat, wurden diese Produkte als „Altarzneimittel“ grundlegend in den Arzneimittelbegriff aufgenommen (grandfathered). Einige Hersteller haben begonnen, pflanzliche Produkte als homöopathische Arzneimittel für leichtere Beschwerden, die keine Behandlung durch einen Arzt erfordern, zu vermarkten. Produkte, die als homöopathische Mittel auf den Markt gebracht werden, müssen den Spezifikationen des Homöopathischen Arzneibuchs der Vereinigten Staaten und einschlägigen Regelungen entsprechen.

### **1.4.4 Pflanzliche Zubereitungen als functional foods**

Sogenannte functional foods (Lebensmittel, denen besondere gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden) sind nicht im Gesetz definiert und können entweder als Lebensmittel oder Nahrungsergänzungsmittel verkauft werden, in Abhängigkeit vom vorgesehenen Gebrauch des Produktes.

### **1.4.5 Kombinationsprodukte einschließlich Kombinationen mit Homöopathika, Nahrungsergänzungsmitteln, Vitaminen und Aminosäuren**

In dem DSHEA werden Kombinationsprodukte als Nahrungsergänzungsmittel gehandelt, wenn sie ein Vitamin, einen Mineralstoff, einen pflanzlichen Bestandteil, eine Aminosäure oder ein Konzentrat, einen Metaboliten, einen Bestandteil, einen Extrakt oder eine Kombination dieser Bestandteile enthalten oder ansonsten nach den einschlägigen Vorgaben des „FDC Act“ gekennzeichnet und vermarktet werden. Ein homöopathisches Arzneimittel

jedoch darf keinen nicht-homöopathisch wirksamen Bestandteil enthalten und ist deshalb selten in Kombinationen von Nahrungsergänzungsmitteln enthalten.

### 1.5 Meist verkaufte pflanzliche Produkte in den USA

Der Gesamtumsatz pflanzlicher Produkte im Einzelhandel in den Vereinigten Staaten wurde 1997 auf 3,24 Mrd. US \$ geschätzt. Die Umsätze in Massenmärkten wurden im Jahre 1997 auf 400 Millionen US \$ geschätzt. Die Top-20 der pflanzlichen Produkten in „Natural Food Stores“ in den Vereinigten Staaten sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2) gelistet:

**Tab. 2:** Top-20 der pflanzlichen Produkte in „Natural Food Stores“ der USA [Quelle: Pflanzliche Arzneimittel in der Europäischen Union, Studie im Auftrag der Europäischen Kommission (AESGP)]

Rang 1997	Pflanze	% des Umsatzes 1997	% des Umsatzes 1996	Rang 1996
1	Sonnenhut	11,93 %	9,60 %	1
2	Knoblauch	8,52 %	7,20 %	2
3	Ginkgo biloba	6,80 %	5,10 %	4
4	Kan. Gelbwurz	5,95 %	4,70 %	5
5	Sägepalme	4,87 %	3,10 %	9
6	Aloe	4,76 %	2,40 %	12
6	Ginseng	4,76 %	6,40 %	3
8	Katzenkralle	3,49 %	2,10 %	14
9	Astagalus	3,07 %	1,30 %	27
10	Cayenne- pfeffer	2,83 %	2,50 %	11
11	Sibirischer Ginseng	2,70 %	3,50 %	7
12	Heidelbeere	2,61 %	1,60 %	23
13	Moosbeere	2,47 %	1,70 %	18
14	Dong quai	2,13 %	1,80 %	17
15	Traubenkern- extrakte	2,07 %	2,00 %	15
16	Amerikanische Faulbaumrinde	1,92 %	2,80 %	10
17	Johanniskraut	1,87 %	keine Angabe	keine Angabe
18	Baldrian	1,73 %	2,20 %	13
19	Ingwer	1,69 %	1,70 %	18
20	Feverfew	1,59 %	1,60 %	23

---

## 1.6 Bedeutung von *Ginkgo biloba*

*Ginkgo biloba* (maidenhair tree) ist vermutlich die älteste noch lebende Baumart und wird häufig als lebendes Fossil bezeichnet. Die Nutzung als Arzneipflanze erfolgte schon sehr früh, vermutlich seitdem Pflanzen als Therapeutika eingesetzt werden. Die Samen des Ginkgo Baumes wurden erstmals in der Yuan-Dynastie (1280-1368) als Arzneipflanze mit den Indikationen Asthma und Husten erwähnt. Die erste orale Anwendung der Ginkgo-Blätter für medizinische Zwecke wurde 1505 publiziert. Nach systematischer Erforschung eines Spezialextraktes aus *Ginkgo biloba*-Blättern wurde ein entsprechendes Heilmittel in Europa zur Behandlung von peripheren und zerebralen Zirkulationsstörungen eingeführt. Der erste patentierte Extrakt EGb 761 aus Ginkgo-Blättern wurde von der Fa. Schwabe 1972 eingereicht. Auf diesen hat sich die Kommission E in ihrer Monographie „Eingestellter Ginkgotrockenextrakt“ bezogen.

*Ginkgo biloba* ist eines der meist verkauften pflanzlichen Produkte in den Vereinigten Staaten ( Top-20, s. Kapitel 1.5) und hat unter anderem aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften an Bedeutung gewonnen. Das Interesse an Antioxidantien hat in Europa und den Vereinigten Staaten stark zugenommen, seitdem Studien gezeigt haben, daß eine Hauptursache für neurodegenerative Erscheinungen und Erkrankungen im Alter in der erhöhten Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress liegen könnte. Möglicherweise vermindern oder verhindern Antioxidantien in Form von Vitaminen (E und C), Gemüse, Obst oder Phytopharmaka den oxidativen Stress und damit Prozesse des Alterns und neurodegenerative Folgeerscheinungen.

Erste Ergebnisse von diätischen Anwendungen (bis zu 8 Monaten) von Erdbeeren, Heidelbeeren, Spinat und Vitamin E an Ratten sind bereits publiziert: Antioxidantien-reiche Lebensmittel zeigen möglicherweise nützliche Effekte bei altersbezogenen funktionalen Defiziten im Gehirn, bei kognitiven Verhaltenseinschränkungen und neurodegenerativen Erkrankungen (Joseph *et al*, 1998) (Joseph *et al*, 1999).

Curcumin, bekannt als Curry-Gewürz, zeigte positive Effekte in einem transgenen Mausmodell für Alzheimer Demenz. Es reduzierte oxidative Schäden und verminderte  $\beta$ -Amyloid-Spiegel, welche in die Pathologie der Alzheimer Demenz involviert sind (Lim *et al*, 2001). Diskutiert werden die antioxidativen Eigenschaften des Curcumins, aber auch seinen NSAID-Eigenschaften (NSAID = nonsteroidal anti-inflammatory drug).

Entzündungsprozesse beim Alzheimer Erkrankten sind charakterisiert durch einen Anstieg von Zytokinen und Aktivierung von Mikroglia. Epidemiologische Studien lassen vermuten, daß Langzeitanwendung von NSAIDs das Risiko, an Alzheimer zu erkranken, senken.

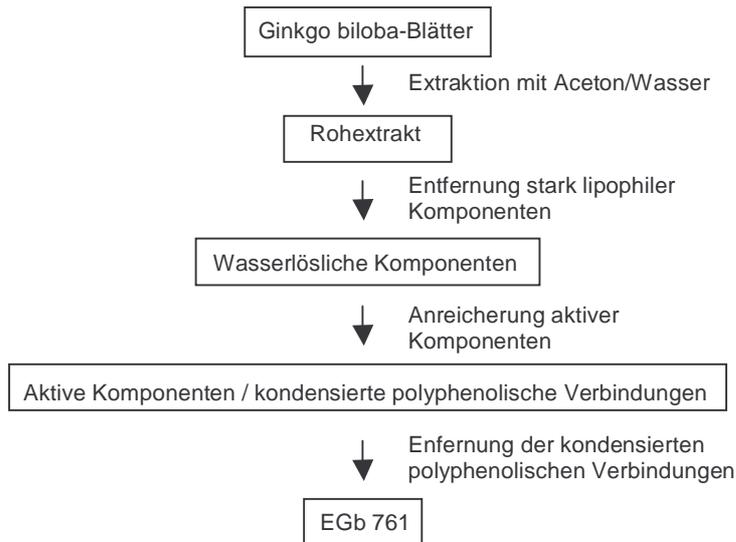
Die Bedeutung von Ginkgo biloba (EGb 761) als Antioxidans wird neben vielen anderen Arbeiten (s. Kapitel 1.8.1) durch eine *ex vivo*-Studie von Schindowski et al. (Schindowski *et al.*, 2001) gestützt. Im Alter vermehrt auftretender oxidativer Streß, der in dieser Studie *ex vivo* durch Behandlung mit 2-Deoxy-D-Ribose simuliert wurde, und dadurch ausgelöste Apoptose konnten in Lymphozyten von Mäusen, die zwei Wochen lang mit 100 mg/kg EGb 761 per os behandelt wurden, verringert werden.

## 1.7 Inhaltsstoffe von Ginkgo biloba-Blättern und -Extrakt

Die in den Ginkgo biloba-Blättern vorkommenden Substanzgruppen sind:

- Flavonoide, die als Aglykone, Glykoside und als methylierte Derivate vorkommen;
- Terpene, worunter die Ginkgolide A, B, C, M und J und das Bilobalid fallen;
- Proanthocyanidine;
- organische Säuren wie Vanillinsäure, Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure (Dihydroxybenzoesäure), Essigsäure, Shikimisäure, Hydroxykynurensäure, Kynurensäure, Ascorbinsäure und Ginkgolsäuren;
- langkettige Polyprenyl-Komponenten;
- Biflavone, zu denen Amentoflavon, Bilobetin, Ginkgetin, Isoginkgetin und Sciadopytisin gehören
- Steroide, wie Sitosterin, Campesterin usw. (DeFeudis, 1998).

Viele der aus Ginkgo-Blättern bekannten Inhaltsstoffe sind in den Extrakten nicht mehr enthalten, da durch die Extraktion bestimmte Stoffe eliminiert oder abgereichert werden. Andere Inhaltsstoffe werden dagegen durch das Verfahren der Extraktion angereichert. Die aktiven Inhaltsstoffe des EGb 761 werden in einem Mehrstufen-Extraktionsprozeß (s. Abb. 1) angereichert, wobei unerwünschte Begleitstoffe eliminiert werden. EGb 761-Extrakt ist standardisiert auf 24 % Flavonglykoside und 6 % Terpenlaktone (Ginkgolide, Bilobalid). Aus Gründen der Verträglichkeit liegt der Gehalt an Biflavonoiden nach Reinigung bei unter 0,1 % und der der Ginkgolsäuren unter 5 ppm (0,0005 %).



**Abb. 1:** Schema zum Extraktionsverfahren des EGb 761 aus Ginkgo biloba-Blättern (nach DeFeudis 1998)

## 1.8 Ginkgo biloba – Pharmakologie

Eine umfassende Übersicht aller Aspekte des Ginkgo biloba-Extraktes EGb 761 – von der Pharmakologie bis zur klinischen Verwendung – wurde von DeFeudis (DeFeudis, 1998) zusammengestellt. Vielfältige biochemische und pharmakologische Effekte werden Ginkgo biloba zugeschrieben. Durch experimentell Studien wurden unter anderem folgende dokumentiert:

- Steigerung des zerebralen Blutflusses
- Beeinflussung rheologischer Parameter des Blutes, PAF-Antagonismus
- protektive Effekte unter ischämischen und hypoxischen Zuständen
- Einfluß auf den Energiehaushalt/-metabolismus von Nervenzellen
- Ödem- und Myelin-protective Wirkung
- Radikalfänger- und antioxidative Eigenschaften
- Effekte auf verschiedene Rezeptorsysteme
- Effekte auf die Wiederaufnahme von Cholin und biogenen Aminen (Enzyminhibierende und enzyminduzierende Eigenschaften)
- Verbesserung des Lernens und Gedächtnisses

---

Alle Befunde zu Wirkungsmechanismen des EGb 761, seien sie durch Experimente auf molekularer, zellulärer oder Gewebe/Organ-Ebene erhoben, betreffen meistens den gesamten Organismus in allen Vorgängen des Lebens, wie z.B. Verhalten, Altern, Erkrankung etc. Trotz der Komplexität der Zusammenhänge (*in vitro* / *in vivo*) sind die pharmakologischen Effekte und die klinischen Studien der besseren Übersicht wegen nachfolgend getrennt aufgeführt worden. Da mit EGb 761 die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden, sind seine Effekte sehr gut beschrieben und dokumentiert.

## 1.8.1 Experimentelle Befunde

### 1.8.1.1 Effekte auf das zentrale Nervensystem (ZNS)

Die hauptsächliche therapeutische Indikation für EGb 761 laut Bundesanzeiger resultiert aus den beobachteten Effekten auf das ZNS und zerebrale Gefäßsystem: Behandlung von Patienten mit Defiziten in zerebralen Funktionen wie Lernen und Gedächtnis und in anderen kognitiven Fähigkeiten oder Defiziten im neurosensorischen System. Wiederholte Gabe von EGb 761 vermag Prozesse des Lernens und des Gedächtnisses positiv zu beeinflussen, zeigt nützliche Effekte bei Tinnitus oder bei der Regenerierung von Funktionen nach Verletzungen des Gehirns (DeFeudis, 1998). Im folgenden sollen die Effekte des Ginkgo biloba am Beispiel von einzelnen Untersuchungen am ZNS angesprochen werden.

#### 1.8.1.1.1 Neuroprotektive Eigenschaften

Vorteilhafte Effekte durch Ginkgo biloba-Extrakt konnten schon an diversen experimentellen Modellen für zerebrale Mikroembolisation, Hypoxie im Gehirn, Reperfusionsschäden und globaler Ischämien gezeigt werden. EGb 761 beschleunigt die Erholung von Defiziten, die aus Verletzungen am frontalen Kortex bzw. Motorkortex resultieren, und verbessert Störungen des Gleichgewichtssinns. Interessanterweise besitzt EGb 761 wohl auch positive Effekte in normalen Prozessen des Alterns, welche sich in biochemischen Veränderungen und Verhaltensänderungen zeigen, wie zum Beispiel die verminderte Bindung von 5 HT<sub>1A</sub> an seine Rezeptoren im zerebralen Kortex und Defizite in erlerntem Verhalten (Brailowsky & Montiel, 1997). Verschiedene Eigenschaften und molekulare Wirkungsmechanismen des Ginkgo biloba-Extraktes und seiner Inhaltsstoffe werden hinsichtlich der neuroprotektiven Effekte diskutiert.

---

#### ❖ Antioxidative und Radikalfänger-Eigenschaften

Freie Radikale partizipieren an Membran-Peroxidationsprozessen, sie attackieren DNA, zytoplasmatische Proteine und extrazelluläre Matrix. Des weiteren sind sie involviert in den Vorgang der Apoptose und des Aß-induzierten neuronalen Zelltodes. Oxidative Prozesse sind pathogenetisch an sehr vielen Erkrankungen (atherosklerotischen Gefäßveränderungen, Demenzerkrankungen verschiedener Genese u.v.m.) oder auch nur allgemein an den Prozessen des Alterns beteiligt. Verbesserung des Gedächtnisses und anderer kognitiver Funktionen werden durch die neuroprotektiven und neurotrophen Effekte des EGb 761 erklärt, die sicher mit der antioxidativen Potenz in Zusammenhang stehen (Barkats *et al*, 1995).

EGb 761 gilt allgemein als Antioxidans - direkt als Radikalfänger und indirekt beispielsweise durch Regulation von Gen- und Enzymaktivitäten. Superoxid-, Hydroxylradikale, Peroxylradikale in wässriger und lipophiler Umgebung, NO und auch Oxo-Ferryl-Radikale (Sauerstoff-Eisen-Radikale) werden von EGb 761 direkt abgefangen (Deby *et al*, 1993). Indirekt wird die Transkription vieler Gene durch EGb 761 oder auch Bilobalid beeinflusst, konsekutiv der antioxidative Status der Zelle aufgerüstet und die DNA vor Schädigungen bewahrt. Man konnte Veränderungen der mRNA Spiegel belegen, die Proteine des intrazellulären Vesikeltransports, mitochondriale Enzyme (z.B. COX), Transkriptionsfaktoren, Antioxidantien, intrazelluläres Glutathion, Enzyme für DNA-Reparatur und –Synthese codieren (Gohil *et al*, 2001) (Chandrasekaran *et al*, 2001).

An vielen verschiedenen Modellen (u.a. an neuronalen, retinalen oder endothelialen Zellen) sind die antioxidativen Eigenschaften des EGb 761 mit Hilfe verschiedenster oxidativer Stressoren (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Aß, NO, Serumentzug, Glutamat etc.) getestet worden. Eine Arbeit von Oyama *et al*. (Oyama *et al*, 1996) zeigt an Neuronen aus dem Zerebellum von Ratten, daß Ginkgo-biloba-Extrakt bereits ab 10 µg/ml vor oxidativer Schädigung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu schützen vermag. In bezug auf die Frage, welcher der Inhaltsstoffe des EGb 761 wirksam ist, wurde der Einfluß der Flavonoide (u.a. Myricetin und Quercetin) auf den intrazellulären Calcium-Spiegel und den oxidativen Metabolismus in Neuronen in einer anderen Arbeit von Oyama *et al*. untersucht (Oyama *et al*, 1994). Weitgehend akzeptiert ist die These, daß exzessive Calcium-Einströme in die Zelle eine Schlüsselrolle im neuronalen Zelltod während einer Ischämie spielen. Exzessiv erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel scheinen die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies durch oxidativen Metabolismus zu erhöhen, welche

---

wiederum an der ischämischen Gehirnschädigung beteiligt sind. EGb 761 bzw. Flavonoide schränken diesen oxidativen Metabolismus aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften ein.

Scholtyssek et al. folgerten aus EPR (Electron Paramagnetic Resonance)-Untersuchungen *in vitro*, daß die antioxidativen Effekte des EGb 761 wohl nicht nur auf Flavonglykoside zurückzuführen sind, sondern u.a. auch auf die Inhaltsstoffe Ginkgolide B, C, J, M und Bilobalid (Scholtyssek *et al*, 1997).

Welche Substanzklasse des EGb 761 (Flavonglykoside / Terpenlaktone) nun primär für die antioxidativen Eigenschaften und damit die Neuroprotektion verantwortlich ist, diskutiert eine Arbeit von Ahlemeyer (Ahlemeyer *et al*, 2001). Da die Flavonglykoside nicht bzw. nicht ausreichend die Blut-Hirnschranke passieren, um effektive Konzentrationen in der Extrazellulär-Flüssigkeit im Gehirn erreichen zu können, müssen wohl die Terpenlaktone die klinischen Effekte des EGb 761 im ZNS auslösen. Für die neuroprotektiven und antiapoptotischen Effekte in unterschiedlichen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen scheinen insbesondere Ginkgolid B und Bilobalid durch ihre Effekte auf den zerebralen Glukose- bzw. Lipid-Metabolismus, die unterschiedlichen Neurotransmitter-Systeme und durch die antioxidativen Fähigkeiten verantwortlich zu sein. Der therapeutische Nutzen von Bilobalid ist allerdings durch seine Instabilität begrenzt, was zu dem Versuch geführt hat, strukturverwandte Moleküle mit ähnlichem pharmakokinetischen Profil aber höherer Stabilität zu synthetisieren.

Eine Untersuchung an PC 12-Zellen (Phäochromozytom-Zellen) zeigt, daß auch das Bilobalid u.a. durch Schutz vor oxidativem Streß die neuroprotektiven Effekte vermittelt. Vermutlich blockiert es frühe, apoptotische Prozesse und vermindert die Erhöhung von proapoptotischen Faktoren wie c-Myc, p53 und Bax und reduziert die Aktivierung der Caspase-3 (Zhou & Zhu, 2000). Zu Apoptose s. Kapitel 1.11.1.

Versuche an humanen Neutrophilen (PMN = PolyMorphonuclear Neutrophils) haben ergeben, daß EGb 761 die Superoxidanion-Produktion nach simultaner Gabe eines Stimulus und des EGb 761 in Konzentrationen > 20 µg/ml zu inhibieren vermag. Dieser protektive Effekt sei nicht nur auf die Hemmung der Superoxid-Anion-Produktion zurückzuführen, sondern auch auf eine Beeinflussung intrazellulärer Signalwege der PMN für die NADPH-Oxidase-Aktivierung (Monboisse *et al*, 1993).

---

*In vitro*- und *in vivo*-Studien konnten eine Inhibition der Lipidperoxidation (späte Stadien der oxidativen Schädigungen) durch die Flavon-Komponenten des EGb 761 (Barth *et al*, 1991) oder aber auch durch den gesamten EGb 761 [50– 100 µg/ml] u.a. an Low Density Lipoprotein (LDL) zeigen (Khalil *et al*, 1996) (Gardès-Albert *et al*, 1995). Ebenso konnte eine Inhibition der Kupfer-vermittelten LDL-Oxidation durch EGb 761 beobachtet werden (Yan *et al*, 1995).

Die positiven *in vivo*-Effekte von EGb 761 an Ratten auf die zirkulierenden und zellulären Lipide und die verbesserte Membranfluidität wurden kürzlich untersucht und korreliert mit den antioxidativen Eigenschaften des Extraktes. Die Behandlung der Ratten mit EGb 761 ergab einen signifikanten Zuwachs an zirkulierenden, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) und auch der PUFAs in Erythrozyten-Membranen, was eine Folge von vermindertem oxidativem Metabolismus (Lipidperoxidation) sein könnte. Es ist bekannt, daß PUFAs die Membranfluidität und auch die Antwort von Zellen auf oxidative Schäden verbessern (Drieu *et al*, 2000).

Im Zusammenhang mit der Verhinderung der Lipidperoxidation wurde die Fähigkeit, Peroxyl-Radikale (die hauptsächlich an der Startreaktion der Lipidperoxidation beteiligt sind) abzufangen, untersucht (Maitra *et al*, 1995). EGb 761 (100 µg/ml) fing sowohl in wäßriger als auch lipophiler Umgebung Peroxyl-Radikale effektiv ab. Diese Effekte könnten in der Prävention der Atherosklerose eine Rolle spielen.

Neben den direkten antioxidativen Effekten (Radikalfänger) konnte man für Ginkgo biloba auch indirekte antioxidative Eigenschaften nachweisen. Flavonoide und andere Inhaltsstoffe von Ginkgo biloba erhöhen die Bindungskapazität von Cytochrom P-450 zu seinen Substraten, wodurch die Bildung freier Sauerstoff-Radikale und die Freisetzung von Superoxid-Anionen vermindert wird (Logani *et al*, 2000). Aus *in vitro*-Studien von Pincemail *et al*. (Pincemail *et al*, 1989) leitet man eine Superoxid-Dismutase-Aktivität für den Extrakt EGb 761 ab. Außerdem fördert EGb 761 die Sekretion von Apolipoprotein E (ApoE), welches eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der Unversehrtheit von Cholesterin und Phospholipiden (Lipidhomöostase) in der Membran im ZNS spielt (Ramassamy *et al*, 1998). Erhöhte Spiegel an ApoE schützen vor Lipidperoxidation und damit Zellschädigung.

---

Der Nutzen von Antioxidativa auf diverse Erkrankungen wird schon lange diskutiert. Daß eine Behandlung mit EGb 761 möglicherweise auch positive Effekte im Falle eines Schlaganfalles haben könnte, wird aufgrund einer Untersuchung von Clark et al. (Clark *et al*, 2001) diskutiert. Getestet wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen EGb 761 an einem Mausmodell mit vorübergehender, fokaler Ischämie. Erstaunlicherweise fanden sie eine deutliche Dosisabhängigkeit des Effektes: geringere Dosen (50 mg/kg KG) bewirkten eine signifikante Reduktion der Infarktgröße, wohingegen die höhere Dosierung von 100 mg/kg KG möglicherweise sogar das Risiko intrazerebraler Blutungen erhöhte. Folgende Mechanismen könnten an der Protektion beteiligt sein: Inhibition der Plättchen- und Leukozyten-Aktivierung/-Adhäsion, die Reduktion freier Radikale und die Steigerung des zerebralen Blutflusses.

❖ Antiapoptotische Eigenschaften

Die antiapoptotischen Eigenschaften des EGb 761 werden in Kapitel 1.11.3 abgehandelt.

❖ PAF-Antagonismus (PAF, Platelet Activating Factor)

Auch die Eigenschaft des PAF-Antagonismus, insbesondere der Ginkgolide, trägt wohl zur Neuroprotektion bei. Im Falle von Gehirntraumata steigen die PAF-Konzentrationen an. Dies scheint von besonderer Wichtigkeit bei der zerebralen Hypoxie zu sein. Es wird postuliert, daß der Anstieg der PAF-Konzentrationen spezifische Neurotransmitter- und Rezeptorfunktionen beeinflusst. So scheint PAF die Konzentrationen an ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und damit möglicherweise auch die Spiegel an neuroprotektiven Fragmenten des ACTHs zu senken. PAF-Antagonisten könnten diesem Prozeß entgegenwirken. Zusätzlich senken PAF-Antagonisten den Glycin-Spiegel, verringern PAF-induzierte Anstiege des intrazellulären Calcium-Spiegels und verringern die Aktivierung der Proteinkinase C und die Funktion der Rezeptoren für excitatorische Aminosäuren (Logani *et al*, 2000). Excitatorische Aminosäuren, wie z. B. Glutamat, werden in größeren Mengen während ischämischer Prozesse ausgeschüttet, induzieren wahrscheinlich die Bildung von PAF und führen damit zu neuronaler Degeneration (van Beek *et al*, 1998).

❖ Einfluß auf Monoamin-Oxidase-Aktivität

Die Monoamin-Oxidase ist ein Enzym, welches im Gehirn die Konzentrationen an Serotonin, Noradrenalin und anderen biogenen Aminen zu regulieren vermag. Neuere *in vitro*-Befunde zeigen, daß Ginkgo biloba die Aktivität der zerebralen Monoaminoxidase A und B reguliert.

Spekuliert wird, ob daraus eventuell die beobachteten anti-Streß-, neuroprotektiven und anxiolytischen Wirkungen resultieren könnten (White *et al.*, 1996). Daß der Effekt von EGb 761 auf die zerebrale MAO-Aktivität *in vivo* höchstwahrscheinlich eher auf eine Down-Regulation als auf eine einfache Inhibition zurückzuführen ist, deuten Pardon *et al.* an (Pardon *et al.*, 2000) (Pardon *et al.*, 1998).

MAO B wandelt bestimmte Protoxine in Toxine um (z. B. MPTP in MPP<sup>+</sup>). Durch Hemmung dieser Umwandlung kann die Schädigung der Neuronen durch die Toxine verhindert werden (Wu & Zhu, 1999). Des weiteren unterbindet die Inhibition der MAO B die oxidative Deaminierung des Dopamins, was wiederum die Bildung freier Radikale und damit neuronalen Schaden verhindert.

Eine *in vitro*-Untersuchung darüber, welche der Ginkgo biloba-Inhaltsstoffe primär für die MAO-inhibierenden Effekte verantwortlich sein könnten, identifizierte Kämpferol und Isorhamnetin. Davon unabhängig wirkte Kämpferol (100 µM) *in vitro* in einem NMDA-vermittelten Neurotoxizitätsmodell und Lipidperoxidationsexperimenten protektiv, so daß eine Kombination vieler unabhängiger Mechanismen (MAO-Inhibition, antioxidative Eigenschaften etc.) für die Neuroprotektion diskutiert wird (Sloley *et al.*, 2000).

Fowler *et al.* schließen die Möglichkeit der Neuroprotektion durch eine MAO-Inhibition aus. Sie konnten zeigen, daß weder MAO A noch B im menschlichen Gehirn (PET – Positron Emission Tomography) gehemmt wird, was dafür spricht, daß andere Mechanismen als die MAO-Hemmung die ZNS-Wirkungen des Ginkgo biloba vermitteln dürften (Fowler *et al.*, 2000).

#### ❖ Einfluß auf NO-Synthase und –Produktion (NO, Stickstoffmonoxid)

NO ist involviert in Zellschädigungen, die mit neurodegenerativen Erkrankungen, excitatorische Toxizität, Ischämie, Epilepsie und Traumata an Gehirn und Rückenmark einhergehen. Ein Überfluß an freien NO-Radikalen wird als schädlicher Faktor in Bezug auf einige ZNS-Erkrankungen angesehen. NO leistet oxidativen Schäden Vorschub, indem es mit Superoxid-Anionen zu Peroxynitrit abreagiert, welches als stabileres Nicht-Radikal zu Protein- und DNA-Schäden und Lipidperoxidation führt (Calapai *et al.*, 2000).

---

Einige Studien haben gezeigt, daß EGb 761 als NO-Fänger fungiert (u.a. (Maccocci *et al*, 1994)). Eine Hemmung der NO-Synthase wird ebenfalls diskutiert (Kobuchi *et al*, 1997). Hitze-Streß an Ratten führte zu einer Up-Regulation der neuronalen NO-Synthase (nNOS) in Gehirnregionen, die einen Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke, Ödeme und Zellschäden aufwiesen. Orale Vorbehandlung mit EGb 761 (50 mg/kg) über 5 Tage konnte sowohl die nNOS Expression als auch die Blut-Hirnschranken-Permeabilität, Gehirnödeme und Zellschädigungen signifikant senken (Sharma *et al*, 1999). Auch in einem Ischämie-Modell wirkte Ginkgo biloba neuroprotektiv durch Inhibition der NO-Bildung (Calapai *et al*, 2000).

❖ **Protektion gegenüber Hypoxie/Ischämie und Gehirnödeme**

Neben einer massiven Freisetzung freier Fettsäuren aus Phospholipiden sind die Hauptmerkmale in der frühen Phase der zerebralen Ischämie Energieverarmung, Generierung freier Radikale, Verlust der Calcium-Homöostase und vermehrte Freisetzung excitatorischer Aminosäuren.

Spinnewyn *et al*. (Spinnewyn *et al*, 1986) untersuchten die Effekte der zerebralen Ischämie, die durch Ligation der rechten Karottis-Arterie in Gerbils induziert wurde, und den Einfluß von EGb 761. Im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollen zeigten die mit EGb 761 vorbehandelten Tiere nach 6 Stunden Ischämie nahezu normale neurologische Befunde und erheblich bessere mitochondriale Funktionen. Daneben waren die Spiegel an Natrium und Wasser in der betroffenen Hemisphäre nur leicht erhöht und die Kaliumgehalte nur geringfügig verringert. Vorbehandlung von Gerbils mit 30 und 60 mg/kg/d EGb 761 peroral erhöhte das Überleben neuronaler Zellen im Hippocampus nach 5 Minuten Ischämie im kompletten Vorderhirn signifikant: 50 % der Neuronen überlebten vs. 10 % unbehandelt (Spinnewyn, 1992). Der PAF-Antagonismus der Ginkgolide scheint bei der zerebralen Ischämie erheblich an der protektiven Wirkung des Ginkgo biloba beteiligt zu sein; neben der Antagonisierung des PAF bewirken die Ginkgolide eine verbesserte Atmungsketteneffizienz (Spinnewyn *et al*, 1987). Daß EGb 761 unter hypoxischen Bedingungen das Überleben gegenüber der unbehandelten Kontrolle verlängert, konnten Karcher *et al*. (Karcher *et al*, 1984) an Ratten zeigen. Vermutlich partizipieren Veränderungen des Energiemetabolismus (Schutz vor ATP-Verarmung, Verzögerung des Glykolysebeginns, Verbesserung der Atmungsketten-Effizienz), was an Endothelzellen gezeigt werden konnte (Janssens *et al*, 1997), und des Blutflusses im Gehirn an den protektiven Effekten des EGb 761 und Bilobalids gegenüber Hypoxie.

---

❖ Inhibition der Bildung neurotoxischer Liganden / Alzheimer Erkrankung

Ginkgo-biloba-Extrakt EGb 761 scheint auch speziell in der  $\beta$ -amyloid-vermittelten Neurotoxizität (Alzheimer-Erkrankung) protektiv zu wirken. Eine Arbeitsgruppe postuliert eine Inhibition der Bildung neurotoxischer Liganden (Yao *et al*, 2001). Sie konnte zeigen, daß Antioxidantien wie Ginkgolide oder Vitamin E die A $\beta$ -induzierte ROS-Produktion und Lipidperoxidation nach Vor- oder Nachbehandlung von neuronalen PC-12 Zellen verhindern können, nicht jedoch die A $\beta$ -induzierte Apoptose und den Zelltod. Allerdings konnte der Zelltod durch Koinkubation von EGb 761 mit A $\beta$ -Protein verhindert werden, was auf eine direkte Interaktion von EGb 761 mit A $\beta$  schließen läßt. Es wird postuliert, daß EGb 761 durch die Interaktion mit A $\beta$ -Protein die Bildung von ADDLs ( $\beta$ -Amyloid-Derived Diffusible neurotoxic soluble Ligands) hemmt, was wiederum zur Neuroprotektion führt.

Eine weitere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls an hippocampalen Zellen zeigen, daß EGb 761 vor A $\beta$ -induzierter Neurotoxizität zu schützen vermag: Sie ging von der These aus, daß die A $\beta$ -vermittelte Neurotoxizität radikalvermittelt ist; entweder induziere das A $\beta$ -Peptid direkt freie Radikale oder indirekt über eine Steigerung intrazellulärer ROS-Produktion. So wäre die Erklärung für den Schutz vor A $\beta$ -induzierter Neurotoxizität ebenfalls über die antioxidativen Eigenschaften des EGb 761 zu erklären (Bastianetto *et al*, 2000a) (Ramassamy *et al*, 2001). Daß die Terpenlaktone wohl ineffektiv und die Flavonglykoside neuroprotektiv in der A $\beta$ -induzierten Toxizität wirken, beschreiben Bastianetto & Quirion (Bastianetto & Quirion, 2001).

❖ Inhibition der PKC (Proteinkinase C)-Aktivität

Man weiß, daß zerebrale Ischämie mit einer raschen Veränderung der PKC-Aktivität in bestimmten Gehirnregionen (z. B. im Hippocampus) einhergeht. Die Ergebnisse aus einer *in vivo*-Studie von Rogue & Malviya an Ratten belegen die PKC-inhibitorischen Eigenschaften des EGb 761 (Rogue & Malviya, 1996). Daß die protektiven Effekte des EGb 761 nach Ischämie eben nicht nur antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide zuzuschreiben sind, sondern eben auch der Fähigkeit die NO-stimulierte PKC-Aktivität zu hemmen, zeigte eine Untersuchung an hippocampalen Zellen von embryonalen Ratten (Bastianetto *et al*, 2000b).

---

#### ❖ Neuromodulatorische Effekte durch veränderte Genexpression

Eine 4-wöchige Diät von Mäusen mit einer Dosis von 36 mg/kg Körpergewicht EGb 761 bewirkte eine veränderte Genexpression im Kortex und Hippokampus. Für folgende Proteine oder mRNA war eine Hochregulation zu verzeichnen, welche alle mit Hirnfunktionen assoziiert sind: neuronale Tyrosin/Threonin-Phosphatase 1, Mikrotubulin-assoziiertes  $\tau$ , AMPA-2, Calcium- und Chloridkanal, Prolaktin und Wachstumshormon (GH) (Watanabe *et al.*, 2001).

##### *1.8.1.1.2 Effekte auf Lernen und Verhalten / Cholinerge Hypothese*

Im passiven Avoidance-Modell beobachteten Stoll *et al.* (Stoll *et al.*, 1996) signifikant schlechteres Lern- und Gedächtnisvermögen in älteren (22 Monate alt) im Vergleich zu jungen Mäusen (3 Monate alt). Die orale Verabreichung von 100 mg EGb 761/kg täglich über 3 Wochen führte zu einer signifikanten Verbesserung des Lernens und Gedächtnisses in alten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen bei den jungen Mäusen gegenüber der unbehandelten Kontrolle kein Effekt zu verzeichnen war. Ähnliche Befunde zeigt eine Arbeit von Winter *et al.* (Winter, 1998) an Ratten.

Die cholinerge Hypothese ist aus der Beobachtung erwachsen, daß der Neurotransmitter Acetylcholin bei Vorgängen des Lernens und des Gedächtnisses eine wichtige Rolle spielt. Aus neurochemischen Studien und Verhaltensstudien leitet man für Ginkgo biloba direkte und indirekte Effekte auf die cholinerge Funktion ab. So ist eine Verbesserung der durch Scopolamin (cholinerges Muskarin-Rezeptor-Antagonist) verursachten Gedächtnisdefizite durch Ginkgo biloba zu verzeichnen. Außerdem sind direkte Effekte von Ginkgo biloba auf cholinerge Rezeptoren gezeigt worden: die Aufnahme von Cholin, dem Precursor des Acetylcholins, in die präsynaptischen cholinergen Neuronen wird gehemmt, und der Acetylcholin-Release wird beeinflußt. Die chronische Gabe von Ginkgo biloba erhöhte die Anzahl cholinerges Muskarin-Rezeptoren (Nathan, 2000).

##### *1.8.1.1.3 Antiaggressive / Antistress-Effekte von EGb 761*

Der menschliche Körper reagiert auf chronischen Stress durch Adaption: Stress-Hormone, wie Cortisol und Adrenalin, werden vermehrt ins Blut ausgeschüttet, was wiederum schädigende (Immunsuppression, Angstzustände, gastrointestinale Dysfunktion, Myokard-Infarkt) oder nützliche Effekte (gesteigerte Wachsamkeit und Aktivität) zur Folge haben kann. Neben vielen anderen schädigenden Effekten, führt exzessive Antwort auf chronischen Stress zu

---

Koronararterien-Verengung, verstärkter Plättchen-Anhaftung und Aggregation und zu erhöhten Blut-Cholesterin-Werten, welche wiederum ein Risikofaktor für Atherosklerose, KHK (koronare Herzkrankheit) und Hypertension sind. EGb 761 besitzt Streß vermindernde Effekte, so daß Behandlung mit Ginkgo biloba-Extrakt möglicherweise nützlich sein kann, um schädliche Reaktionen auf den Streß, zu denen auch Angst und Depression zählen, zu überwinden (DeFeudis, 1998). Porsolt et al. zeigten an verschiedenen Nager-Verhaltensmodellen die anti-Stress Effekte von EGb 761 nach wiederholter oraler Gabe, welche nicht ohne weiteres auf klassische anxiolytische oder antidepressive Aktivität zurückzuführen seien (Porsolt *et al*, 1992).

#### ❖ *Einfluß auf das serotonerge System*

Eine gesteigerte serotonerge Neurotransmission scheint eine bedeutende Rolle in der Ätiologie und Auswirkung von Streß- und Angsterkrankungen zu spielen. An gestreßten Mäusen und Ratten konnten tatsächlich eine erhöhte Freisetzung und ein gesteigerter Umsatz von Serotonin beobachtet werden. Außerdem konnte man in manchen Streßbedingungen eine veränderte Serotonin-Rezeptor-Funktionalität feststellen. Ginkgo biloba konnte eine durch Kältestreß induzierte verminderte Rezeptorfunktionalität von 5-HT<sub>1A</sub> beheben (Bolanos-Jimenez *et al*, 1995).

In-vitro-Experimente an Maus-Synaptosomen haben gezeigt, daß EGb 761 konzentrationsabhängig und biphasisch den synaptosomalen Uptake von 5-HT (5-Hydroxytryptamin) zu steigern (4 – 16 µg/ml) und in höheren Konzentrationen (32 – 2000 µg/ml) zu hemmen vermag. Allerdings ist die Hemmung in höheren Konzentrationen unspezifisch und betrifft auch den Cholin- und Dopamin-Uptake. Ex-vivo-Studien an Mäusen (100 – 200 mg/kg KG) zeigten eine um 25 – 30 % gesteigerte Serotonin-Aufnahme (Ramassamy *et al*, 1992).

Verhaltensstudien an MAO-A KO Mäusen haben gezeigt, daß EGb 761 angstlösend wirkt, indem die 5-HT-Aktivität (vermittelt durch 5-HT<sub>2A</sub> –Rezeptoren) gesenkt wird. Monoaminoxidasen katalysieren die oxidative Deaminierung von Neurotransmittern im Gehirn und produzieren Hydrogenperoxide. MAO A hat eine höhere Affinität zu 5-HT und Noradrenalin (NE = Norepinephrin), wohingegen MAO B eine höhere zu Phenylethylamin und Benzylamin besitzt. Mäuse mit einem MAO A Defekt besitzen erhöhte Level an 5-HT und NE, und männliche Tiere zeigen verstärkt aggressives Verhalten. Dieses kann durch EGb

---

761 verringert werden (Shih *et al*, 2000). Daß EGb 761 als indirekter 5-HT-Antagonist wirken kann, zeigt sich auch an Thrombozyten, deren Stimulation dadurch inhibiert wird.

❖ Einfluß auf das glucocorticoide System

Glucocorticoide besitzen - neben nützlichen, regulierenden Effekten – ein großes pathogenes Potential einschließlich Neurotoxizität und Immunsuppression. Die Glucocorticoid-Synthese wird reguliert durch ACTH (Adrenocorticotrophes Hormon), welches die Expression von Steroid-Regulator-Protein bewirkt. Dieses veranlaßt wiederum die Expression des adrenalen peripheren Benzodiazepin-Rezeptors (PBR), einem Schlüsselement in der Regulation des Cholesterin-Transportes von der äußeren zur inneren Mitochondrien-Membran, an der der erste Schritt der Steroid-Synthese durch Cytochrom p-450 beginnt. Möglicherweise handelt es sich bei PBR um einen Kanal oder Transporter für Cholesterin in der äußeren Mitochondrienmembran.

Durch *in vivo* Behandlung von Ratten mit EGb 761 und seinen bioaktiven Komponenten Ginkgolid A und B konnte spezifisch die Liganden-Bindungskapazität, Protein- und m-RNA-Expression des PBR in der Nebennierenrinde herunterreguliert werden. Eine Herunterregulation des PBR bewirkt eine verminderte Corticosteroid-Synthese, da der Transport des Cholesterins von der äußeren zur inneren Mitochondrien-Membran gestört ist. Wider Erwarten resultierte nach der EGb 761-induzierten Abnahme der Glucocorticoid-Spiegel keine reflektorische Zunahme der ACTH- bzw. CRH-Spiegel (corticotropin releasing hormon). Dies spricht zusätzlich für die Anwesenheit inhibierender Substanzen für den ACTH- oder CRH-Release im EGb 761 (Amri *et al*, 1996) (Brochet *et al*, 1999). Diesen Eingriff in den Regelmechanismus der Steroidsynthese durch EGb 761 konnte die gleiche Arbeitsgruppe auch *ex-vivo* an Nebennierenrinden-Zellen aus der Ratte zeigen (Amri *et al*, 1997). Anti-Stress- und neuroprotektive Effekte des EGb 761 und Bilobalids werden u.a. auf die verminderte Glucocorticoid-Synthese zurückgeführt. Eine Untersuchung von Rapin *et al*. (Rapin *et al*, 1997) zeigte, daß Corticoide in Korrelation zu der Zahl der Glucocorticoid-Rezeptoren das kognitive Verhalten verändern und daß schädliche Effekte verursacht durch ein Übermaß an Glucocorticoiden durch EGb 761, einem Anti-Streß-Effektor, aber nicht durch Diazepam, einem anxiolytisch wirkenden Medikament, verhindert werden können.

#### 1.8.1.1.4 Antikonvulsive und antidepressive Effekte von EGb 761

GABA (GammaAminoButuricAcid) ist der hauptsächliche inhibitorische Neurotransmitter im ZNS. Er wird aus Glutamat durch die Glutamat-Decarboxylase synthetisiert. GABA Synapsen sind in scheinbar allen Gehirn-Strukturen vorhanden. GABA wirkt der Glutamat-induzierten Exzitation entgegen. Die Verminderung der GABA-ergen inhibitorischen Neurotransmission führt somit zu Konvulsionen, wohingegen die Potenzierung GABAerger Transmission zu antikonvulsiven Effekten führt.

Das Sesquiterpenlaktone Bilobalid, was etwa zu 3 % im EGb 761 vorliegt, scheint für die antikonvulsiven Effekte, die experimentell beobachtet wurden, verantwortlich zu sein. Daß Bilobalid die GABA-Level erhöht und dabei die Glutamat-Level nicht beeinflusst, zeigt eine Arbeit von Sasaki (Sasaki *et al*, 1999). Diskutiert wird eine Verstärkung der Glutaminsäure-Decarboxylase-Aktivität und -Expression, womit die Erhöhung der GABA-Level erklärt werden könnte. Auch die Vigilanz verbessernden und Antidepressiva-ähnlichen Effekte des EGb 761, die klinisch beobachtet werden konnten, werden auf Wirkungen am GABA-regulierten Chlorid-Kanal im ZNS zurückgeführt (Brochet *et al*, 1999).

#### 1.8.1.1.5 Effekte von EGb 761 auf das neurosensorische System

EGb 761 besitzt des weiteren positive Effekte auf das neurosensorische System. Sowohl die Sinne des Hörens und Sehens als auch die des Gleichgewichtes können vor schädlichen Einflüssen durch freie Sauerstoff-Radikale geschützt werden. Durch die antioxidativen und Radikalfänger-Eigenschaften vermindert Ginkgo die funktionale Verschlechterung, die z. B. aus Ischämie-Reperfusion, Photodegeneration oder diabetischer Retinopathie resultiert. Zusätzlich scheint Ginkgo noch neurotrophes / neuritogenes Potential zu besitzen (DeFeudis, 1998). Bei Verletzungen des Gleichgewichtsorgans beschleunigt Ginkgo biloba die Wiederfindung bzw. Regeneration des Gleichgewichtsinnes. Es konnte gezeigt werden, daß die Nicht-Terpen-Fraktion der wirkungsrelevante Anteil des EGb 761 in diesem ZNS-Plastizitätsmodell war (Tighilet & Lacour, 1995).

#### 1.8.1.2 Effekte auf Herz-Kreislauf-System

Herzkrankheiten und Herzinfarkt gehen häufig mit myokardialen Ischämien einher. Wiederherstellung der Blut- und damit Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes ruft charakteristische Gewebeschädigungen hervor – bekannt als Reperfusionsschäden, die sich in Symptomen wie ventrikuläre Arrhythmien und Verschlechterung der Herzleistung

---

manifestieren. Primär resultieren diese Perfusionsschäden aus der Oxidation myokardialer Membranlipide durch freie Radikale, die während den ersten Minuten der Reperfusion auftreten. Des Weiteren hat PAF, ein Entzündungsmediator entstanden im Arachidonsäure-Metabolismus durch intrazelluläre Calcium-Überladung, einen großen Anteil an den Reperfusionsschäden (Haines *et al*, 2000).

#### *1.8.1.2.1 Kardioprotektive und anti-ischämische Effekte von EGb 761*

Für die kardioprotektiven Wirkungen von EGb 761 werden überwiegend die gleichen molekularen Mechanismen diskutiert, wie für die neuroprotektiven (s.o.). Eine führende Hypothese der Protektion durch EGb 761 bei reperfusionsbedingten Schädigungen des Herzens ist die Radikalfängereigenschaft. Die bei der Reperfusion gebildeten freien Radikale (Superoxid-, Hydroxyl-Radikale u.a.) werden von EGb 761 / Flavonoiden abgefangen. Daneben gibt es den Hinweis, daß die Terpenlaktone zusätzlich kardioprotektiv wirken, indem sie auf Membran- und/oder mitochondrialer Ebene während der präischämischen Periode angreifen (Liebgott *et al*, 2000). Eine andere Arbeit konnte zeigen, daß die Terpenlaktone (insbesondere Ginkgolid A, B und Bilobalid) in die Inhibition der Radikalbildung involviert sind und nicht direkt als Radikalfänger fungieren (Pietri *et al*, 1997). Auch der PAF-antagonistische Effekt des EGb 761 trägt wahrscheinlich zur Protektion vor reperfusionsbedingten Schädigungen bei (Haines *et al*, 2000). Eine weitere Erklärung für die kardioprotektiven und regenerationsfördernden Wirkungen nach Ischämie / Reperfusion ist die Beobachtung, daß EGb 761 als potenter Inhibitor der NO-Produktion durch Hemmung der iNOS mRNA-Expression und als direkter NO-Fänger fungiert (Varga *et al*, 1999). Daß EGb 761 die NO-Spiegel reguliert und die durch freie Sauerstoff-Radikale induzierte Lipid-Peroxidation inhibiert, zeigen auch die *in vivo* Befunde einer Arbeit von Shen an Ratten (Shen *et al*, 1998).

Eine Arbeit an Kardiomyozyten schreibt Ginkgo biloba-Extrakt (nicht jedoch seinen Terpenlaktonen) einen Teil der protektiven Wirkungen bei oxidativem Streß zu. Es wurde ein Effekt auf die Hämoxygenase (HO)-Gen-Expression und Aktivität durch EGb 761 gefunden. HO ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Häm-Katabolismus, welches die oxidative Spaltung des Häm-Moleküls zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen katalysiert. Biliverdin wird nachfolgend in Bilirubin umgewandelt. HO hat eine Reihe protektiver Effekte gegen oxidativen Streß: erstens sind Biliverdin und Bilirubin selbst in der Zelle antioxidativ wirksam und zweitens führt der Abbau des Häm-Moleküls zur Induktion der Ferritin-

---

Synthese. Ferritin wiederum fängt freies Eisen ab, welches nachfolgend nicht mehr als Katalysator schädigender, oxidativer Prozesse zur Verfügung steht. Möglicherweise geht außerdem mit der Induktion der HO-1-Gen-Expression ein signifikanter Zuwachs der Gluthation-Peroxidase-Gen-Expression und –Aktivität einher, was schließlich zur Regulation intrazellulärer GSH-Spiegel führt (GSH, Glutathion) (Chen *et al*, 2001).

#### 1.8.1.2.2 Vasomodulierende Effekte von EGb 761

Im Gefäßsystem zeigt EGb 761 komplexe, multifaktorielle Effekte. Es verbessert den peripheren und zerebralen Blutfluß und die Mikrozirkulation und verringert die Kapillarpermeabilität. Außerdem verbessert EGb 761 die Blutflusseigenschaften und besitzt antithrombotische Effekte, ähnlich dem von Aspirin in einem experimentellen Thrombose-Modell (Belougne *et al*, 1996). EGb 761 relaxiert spasmodische Blutgefäße und kontrahiert solche, die abnormal erweitert sind. Kontraktionen, ausgelöst durch EGb 761, scheinen direkt (z. B. durch einen Release an Katecholaminen) oder indirekt das katecholaminerge System zu involvieren (Auguet *et al*, 1982a). Eine indirekte Beeinflussung des katecholaminergen Systems könnte aus der Hemmung der COMT (Catechol-O-Methyl-Transferase), der MAO (Monoamin-Oxidase) (White *et al*, 1996) und der Inhibition des Katecholamin-Reuptakes resultieren, durch welche der vasoregulierende Effekt der Katecholamine verstärkt würde (Auguet *et al*, 1982b) (Logani *et al*, 2000).

Für den vasorelaxierenden Effekt des EGb 761 scheint ein intaktes Endothel nötig zu sein. Eine gesteigerte Freisetzung an Prostacyclin (PGI<sub>2</sub> = relaxierendes und antithrombotisch wirkendes Prostaglandin) oder EDRF (endothel derived relaxing factor)/NO aus intaktem Endothel könnte die relaxierenden Effekte vermitteln. Auch die Radikalfängereigenschaften könnten für die vasorelaxierenden Effekte verantwortlich sein, indem NO letztendlich vor der Oxidation (z.B. durch Superoxid-Anionen) geschützt wird (Auguet & Clostre, 1997). Unsicher ist, ob EGb 761 mit der Generierung und/oder dem Release vasoaktiver Endothelfaktoren interferiert. Ein wichtiger Mechanismus – neben der Radikalfängereigenschaft – könnte die Inhibition einer zyklischen, nukleotidischen Phosphodiesterase (PDE) sein; diskutiert wird die PDE4 (Campos-Toimil *et al*, 2000).

Eine Studie, die die These unterstützt, daß EGb 761 mit der Generierung vasoaktiver Endothelfaktoren interagiert, ist eine Arbeit von Cheung und Siow (Cheung & Siow, 2001). Sie untersuchte den Effekt von Ginkgolid A/B und Bilobalid auf die NO-Produktion an

menschlichen Endothelzellen (HUVEC) und Makrophagen. Die NO-Isoform iNOS (inducible NO-synthase) wird überwiegend in Makrophagen exprimiert, die konstitutive eNOS (endothelial NO-synthase) hauptsächlich in Endothelzellen. Des weiteren unterscheiden sich die beiden Isoformen dadurch, daß eNOS Calcium abhängig aktiviert wird, wohingegen iNOS Calcium unabhängig ist. Ginkgolid A, B und Bilobalid inhibieren die NO-Produktion in Makrophagen durch Verminderung der iNOS mRNA-Expression. Sie haben keinen Effekt auf die eNOS vermittelte NO-Produktion in Endothelzellen. Diese Komponenten spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der EGb vermittelten selektiven Hemmung der iNOS Expression in Gefäßwänden und der damit zusammenhängenden therapeutischen Regulierung der NO-Produktion bei Gefäß-Erkrankungen, siehe auch (Cheung *et al*, 1999). Eine Arbeit an Ratten konnte zeigen, daß altersbedingte Veränderungen des kardiovaskulären Systems – wie zum Beispiel erhöhter Blutdruck oder Herzschlag – durch eine Kombination von Meclofenoxat und EGb 761 verbessert werden konnten. Eine Erklärung für den erhöhten Blutdruck im Alter ist die Rigidisierung der arteriellen Blutgefäße mit geringerer Dehnbarkeit und verringertem kardialen Output, welche zum Teil auf Veränderungen der Phospholipid-Membranzusammensetzung und membranständigen Rezeptoren zurückzuführen ist. Meclofenoxat hat - neben anderen biochemischen und physiologischen Wirkungen - einen direkten Effekt auf die Membranfluidität. EGb 761 wirkt als Radikalfänger und Extrakt mit SOD-Aktivität und verringert dadurch die schädlichen, oxidativen Prozesse in Zellen und an Membranen (al-Zuhair *et al*, 1998). Auch an isolierten Endothelzellen konnten protektive Effekte von EGb 761 nach Ischämie verifiziert werden. Endothelzellen spielen aufgrund ihrer Lokalisation zwischen Blut und Gewebe eine Schlüsselrolle in den vaskulären Erkrankungen und sind das erste Target toxischer Prozesse, die während ischämischer Ereignisse durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel in Gang gesetzt werden. Ginkgo biloba-Extrakt schützt Endothelzellen, evtl. aufgrund der Flavonoide, vor zytotoxischen Effekten durch freie Radikale, die durch die Sauerstoffwiederversorgung nach der Hypoxie generiert werden (van Beek *et al*, 1998).

Der Abfall der ATP-Konzentration und die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> mit gleichzeitiger Stimulation der Synthese inflammatorischer Mediatoren sind zwei der verschiedensten Ereignisse nach Hypoxie an Endothelzellen. Ginkgo biloba-Extrakt reduziert den ATP-Abfall und die Aktivierung der PLA<sub>2</sub> hauptsächlich durch Terpenlaktone bzw. Bilobalid. Außerdem wird der Beginn der Glykolyse, die während der Hypoxie aktiviert wird,

---

verzögert und die mitochondriale Atmungsketteneffektivität erhöht (Michiels *et al*, 1994) (Janssens *et al*, 1995)

#### 1.8.1.2.3 Effekte von EGb 761 auf die Eigenschaften des Blutes / hämorheologische Effekte

PAF (Platelet Activating Factor) ist ein potenter Phospholipid-Entzündungsmediator, welcher in die Pathophysiologie verschiedenster Erkrankungen involviert ist, sei es auf vaskulärer Ebene peripher (pAOD = peripheral Arterial Occlusive Disease), im Herzen (Herzinfarkt), im Gehirn (Hirnfarkt) oder in der Lunge. Es ist ein chemotaktisches Agens für neutrophile Zellen, wodurch Superoxid-Freisetzung, Aggregation und Degranulation ausgelöst werden.

Als stärkster PAF-Antagonist aus Ginkgo biloba-Extrakt konnte Ginkgolid B in Plättchenaggregations-Assays determiniert werden (Braquet & Koltai, 1994) (Kurihara *et al*, 1989) (Nunez *et al*, 1986) (Etienne *et al*, 1985). Ginkgolid B verbessert die Blutrheologie und Mikrozirkulation. Außerdem verhindert es die durch PAF induzierte Superoxid- und Zytokin-Generierung, wie TNF (Tumornekrosefaktor) aus isolierten neutrophilen Zellen, und moduliert die PAF-Effekte auf das Gefäßbett (van Beek *et al*, 1998).

#### 1.8.1.3 Effekte von EGb 761 auf andere Organe, Gewebe und Zellen

Die bis dato publizierten Untersuchungen zu den Wirkungen von EGb 761 haben gezeigt, daß die Effekte des Ginkgo biloba-Extraktes sehr vielfältig sind und viele verschiedene Organe, Gewebe und Strukturen betreffen. Neben Effekte auf das ZNS und Herz-Kreislauf-System sind zu nennen:

##### ❖ Effekte auf die Leber

Daß Ginkgo biloba nach Ischämie die Reperfusionsschäden zu reduzieren vermag, wurde bereits an Ischämie/Reperfusionversuchen am Herzen mehrfach gezeigt. Eine neuere Arbeit von Topp *et al*. konnte an Ratten eine protektive Wirkung von EGb 761 an Leber zeigen, was für Lebertransplantationen von Bedeutung sein könnte. EGb 761 verminderte in diesem Modell die reperfusionsbedingten Schädigungen nach Ischämie. Die verringerte Leukozyten-Aktivierung und die verbesserte hepatische Mikrozirkulation könnte möglicherweise zu einer geringeren Inzidenz von Leberdysfunktionen nach Transplantation führen (Topp *et al*, 2001).

---

#### ❖ Effekte auf Mitochondrien

Mitochondrien und insbesondere ihre DNA (mtDNA) sind Hauptangriffspunkte freier Radikale und spielen eine wesentliche Rolle in der Theorie des Alterns. Freie Sauerstoffradikale sind verantwortlich für die altersbedingte Verschlechterung von Zellen und Geweben. EGb 761 schützt als Antioxidativum mitochondriale DNA und Glutathion vor oxidativen Schäden und verhindert die Veränderungen der Mitochondrien-Morphologie und – Funktion in Gehirn und Leber (Sastre *et al*, 2000).

#### ❖ Effekte am Auge bzw. an retinalen Zellen

Untersuchungen an retinalen Gliazellen haben ergeben, daß EGb 761 die Organellen der Zellen (Mitochondrien etc.) vor den schädlichen Einflüssen von freien Radikalen zu schützen vermag, indem EGb 761 direkt einerseits als Radikalfänger dient und andererseits der Bildung freier Radikale entgegenwirkt. Indirekt scheint EGb 761 durch Erhöhung der Kapazität an endogenem GSH (einem endogenen Radikalfänger-System) zu wirken. Dadurch bleibt die Struktur und Funktion normaler Mitochondrien erhalten (Paasche *et al*, 2000). Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie an Hasen, die eine Retinopathie induziert bekamen. Sie wies einen engen pathologischen Zusammenhang zwischen freien Radikalen, Inflammation und Proliferationserkrankungen des Auges auf. Sowohl EGb 761 als auch Superoxid-Dismutase (SOD) konnten die Entzündungs- und Proliferationsprozesse im Auge signifikant senken (Baudouin *et al*, 1999).

#### 1.8.1.4 Effekte auf Transmitter- und Rezeptor-Systeme (s. auch Kapitel 1.8.1.1.3)

Ramassamy *et al*. (Ramassamy *et al*, 1992) zeigten, daß EGb 761 die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-5-Hydroxytryptamin in zerebrale, kortikale Synaptosomen der Maus *in vitro* beeinflusst. In Konzentrationen zwischen 4 und 16 µg/ml führte EGb 761 *in vitro* zu einer Steigerung von 23 % der 5-HT-Aufnahme. Eine ähnliche Steigerung konnte *ex vivo* in kortikalen Synaptosomen gezeigt werden, nachdem die Tiere oral mit 100 mg/kg 16h und 2 h vor der Präparation behandelt wurden oder 2 x 100 mg/kg täglich an 4 aufeinanderfolgenden Tagen erhalten hatten. Daß die Aufnahme von Neurotransmittern ([<sup>3</sup>H]-NE, [<sup>3</sup>H]-DA und [<sup>3</sup>H]-5-HT) durch EGb 761 auch gehemmt werden kann, zeigen *in vitro*-Befunde an isolierten Synaptosomen. Folgende Hemmkonstanten wurden gefunden K<sub>i</sub> [mg/ml]: NE = 0,12 ± 0,01, DA = 0,21 ± 0,01, 5-HT = 0,44 ± 0,02 (Taylor, 1992). Außerdem konnte in dieser Untersuchung nachgewiesen werden, daß EGb 761 mit EAA-Rezeptoren (Excitatory Amino Acid) interagiert, insbesondere als nicht kompetitiver Inhibitor an NMDA-Rezeptoren. Die anti-

---

ischämischen und neuroprotektiven Effekte des Ginkgo biloba-Extraktes könnten teilweise über eine Hemmung der durch EAA ausgelösten Exzitotoxizität, Ischämie und Neurodegeneration erklärt werden (Taylor, 1992). Huguet et al. (Huguet *et al*, 1994) konnten eine signifikante Abnahme der Rezeptorendichte von  $\alpha_2$  auf 32% und von 5HT<sub>1A</sub> auf 22% im Vergleich von alten (24 Mo.) zu jungen Ratten (4 Mo.) zeigen. Die Verabreichung von 5 mg EGb 761/kg täglich über 21 Tage steigerte die Rezeptorendichte in alten Ratten, wohingegen sie in jungen Ratten unbeeinflusst blieb.

Aufgrund der antioxidativen Kapazität verhinderte EGb 761 (ab 2  $\mu\text{g/ml}$ ) die durch freie Radikale verursachten Veränderungen der synaptosomalen Membranfluidität und Serotonin-Aufnahme-Fähigkeit *in vitro* (Ramassamy *et al*, 1993).

#### 1.8.1.5 Metabolische Effekte von EGb 761

Die Höhe des Energieumsatzes moduliert die Intensität der Zellantwort auf Streß und andere Faktoren. Unter stressenden Bedingungen wächst der ATP (Adenosintriphosphat)-Verbrauch, die ATP-Konzentrationen in der Zelle sinken, was wiederum zu einer Schwächung der Abwehr- und Reparaturmechanismen führt. Die Abnahme des ATP-Gehaltes in der Zelle führt nicht nur zu einer Zunahme der Zellmortalität, sondern auch zu einer Beschleunigung der Zellalterung. EGb 761 wirkt protektiv, in dem es den ATP-Turnover steigert: erstens durch erhöhten Glucose-Transport und zweitens durch Verbesserung der Effektivität der Atmungskette in den Mitochondrien (Toussaint *et al*, 1995). Außerdem vermag Ginkgo biloba den Glukose-Verbrauch im Gehirn zu reduzieren und wirkt möglicherweise aufgrund dieser Eigenschaft in Situationen der Ischämie oder Anoxie neuroprotektiv (Lamour *et al*, 1992). In glatten Muskelzellen steigert EGb 761 die Glukose-Aufnahme und Glykogen-Synthese in konzentrationsabhängiger Weise. Daneben verzögern EGb 761 und Bilobalid den Beginn der hypoxischen Glykolyse in hypoxischen Endothelzellen durch Verlängerung der ATP-Bildung (Diamond *et al*, 2000).

---

## 1.8.2 Klinische Studien

### 1.8.2.1 Klinische Studien zu den Effekten von EGb 761 auf das zentrale Nervensystem

#### 1.8.2.1.1 Effekte auf kognitive Fähigkeiten und bei Hirnleistungsstörungen (Gedächtnis, Lernen, Aufmerksamkeit etc.)

Ginkgo biloba wird als Nootropikum eingesetzt. Der Grund für die Fähigkeit, kognitive Leistungen verbessern zu können, wird in einer Übersichtsarbeit von Nathan (Nathan, 2000) als Kombination mehrerer pharmakodynamischer Effekte beschrieben. Darunter zählen der PAF-antagonistische Effekt, die Radikalfängereigenschaft, Monoaminoxidase-inhibierende Effekte und die Modulation cholinergischer Funktionen.

In einer Anwendungsbeobachtung, in der 5341 Patienten mit Hirnleistungsstörungen ambulant über drei Monate täglich mit 150 mg Ginkgo biloba-Extrakt LI 1370 behandelt wurden, führte die Therapie (neben Besserung von Schwindel, Tinnitus und Kopfschmerzen) bei 74% zu einer Verbesserung des Allgemeinzustandes und zu einer signifikanten Verbesserung der Vergesslichkeit (55,2%), der Konzentrationsschwäche (62%), der Verwirrtheit (53,4%), der Stimmungslabilität (66,5%) und des Sozialverhaltens (58,2%). Die meisten Patienten wurden wegen Begleiterkrankungen parallel mit anderen Medikamenten behandelt. Ginkgo wurde sehr gut vertragen, unerwünschte Arzneimittelwirkungen traten extrem selten auf (0,7%) (Grabe & Freyberger, 1999). Eine weitere Studie über 6 Wochen demonstrierte an 80 Patienten im Vergleich zu Dihydroergotoxin [3 x 1,5 mg/d] die Wirksamkeit von Ginkgo biloba-Extrakt [3 x 40 mg/d] bei altersassoziierter Verschlechterung des Gedächtnisses (Gerhardt *et al*, 1990).

Akute Gaben von standardisiertem Ginkgo-Extrakt (120, 240 und 360 mg) verbesserte, dosisabhängig anhaltend, die Aufmerksamkeit von 20 jungen, gesunden Probanden gegenüber der Placebo-Gruppe (Drieu *et al*, 2000). Eine andere Studie nach Akutgabe an gesunden Probanden zeigt in erster Linie eine Verbesserung des Gedächtnisses, weniger eine Verbesserung der Aufmerksamkeit (Rigney *et al*, 1999). Ältere, kognitiv intakte Probanden profitierten durch eine 6-wöchigen Gabe von EGb 761 [180 mg/Tag] nur teilweise in ihren kognitiven Fähigkeiten, was mit Hilfe verschiedener neuropsychologischer Tests evaluiert wurde (Mix & Crews, 2000). An 18 älteren Probanden mit altersabhängig verringerter Gedächtnisleistung konnte durch Gaben von 320 oder 600 mg 1h vor dem Test (dual-coding

---

test) die Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung beschleunigt werden (Allain *et al*, 1995).

#### 1.8.2.1.2 Effekte bei Demenz, Alzheimer Erkrankung und vaskuläre Demenz

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, daß durch die Verabreichung von Ginkgo biloba-Extrakt EGb 761 die Progression von Demenzen des Alzheimer Typs oder mit Multi-Infarktgenese substantiell verringert werden kann. EGb 761 interferiert mit dem Krankheitsprozeß im ZNS auf verschiedenen Ebenen: es verbessert den Glukose-Metabolismus im Gehirn, stabilisiert Zellmembranen, agiert als Antioxidans, und dank seiner Radikalfängereigenschaften beeinflusst es den Mechanismus, durch welchen das  $\beta$ -Amyloid-Protein neurotoxisch wirkt. Außerdem steigt die Zahl der cholinergen Rezeptoren, welche gewöhnlich im Alter abnimmt, und die Synthese und Freisetzung von Acetylcholin nimmt zu. Des weiteren wird einigen Prozessen, die zu Neurodegeneration und Zelltod führen, entgegengewirkt (Maurer, 2001).

Die meisten klinischen Studien belegen eine Wirksamkeit von Ginkgo biloba – peroral verabreicht - bei älteren Patienten mit geringer bis mittelschwerer Demenz vom Alzheimer Typ oder anderer Genese nach verschiedenen Behandlungszeiträumen: 12 Wochen 240 mg EGb 761/Tag (Maurer *et al*, 1997), 24 Wochen 240 mg EGb 761/Tag (Kanowski *et al*, 1996) oder 26 Wochen 3 x 40 mg EGb 761/Tag (Le Bars *et al*, 2000). Die Therapie mit Ginkgo biloba im Falle von Demenz gilt als sicher und bewirkt in einer beträchtlichen Anzahl von Fällen eine meßbare Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und des sozialen Verhaltens oder zumindest eine Stabilisierung des bisherigen Zustandes für 6 Monate bis zu einem Jahr (nach 52 wöchiger Behandlung mit 120 mg EGb 761/Tag) (Le Bars *et al*, 1997).

Die Wirksamkeit kurzdauernder Infusionsbehandlungen mit Ginkgo biloba-Spezialextrakt EGb 761 (200 mg pro Tag an vier Tagen in der Woche über 4 Wochen) bei Demenz vom vaskulären und Alzheimer-Typ konnte an 40 Patienten in einer plazebokontrollierten, randomisierten Doppelblindstudie 1996 belegt werden (Haase *et al*, 1996).

Eine mit erheblichen methodischen Mängeln behaftete 24-wöchige, randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte Studie an Demenz-Kranken oder Patienten mit altersassoziierten Hirnleistungsstörungen zeigte, daß durch Ginkgo-Behandlung (160 – 240 mg pro Tag peroral) keine Verbesserung - gemessen an diversen neuropsychologischen Tests - zu verzeichnen war (van Dongen *et al*, 2000).

---

### 1.8.2.1.3 Effekte bei Depression

Eine 10-wöchige, plazebokontrollierte Doppelblindstudie an 27 Patienten zur Wirksamkeit von Ginkgo bei Winter-Depressionen konnte keine Überlegenheit von Ginkgo biloba-Extrakt (2 x 24 mg Flavonglykoside + 2 x 6 mg Terpenlaktone/Tag) gegenüber Plazebo hinsichtlich der Verhinderung der Symptome einer Depression zeigen (Lingaerde *et al*, 1999).

### 1.8.2.2 Klinische Studien zur Behandlung von peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen mit EGb 761

Eine signifikante Verbesserung der Hämorheologie, gemessen an rheologischen Parametern und Fibrinogen-Spiegeln, konnte in einer zwölfwöchigen Studie mit EGb 761 (3 \* 80 mg pro Tag) an 20 Patienten unterschiedlicher Grunderkrankungen (Koronare Herzkrankheit, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus) gezeigt werden (Witte *et al*, 1992). Ähnliche Befunde (Zunahme der Mikrozirkulation und verbesserte Vollblutviskoelastizität) wies eine Studie an 42 Patienten mit pathologischen Viskoelastizitätswerten nach einmaliger i.v.-Gabe von 50, 100, 150 oder 200 mg EGb 761 (Koltringer *et al*, 1993) oder an 48 Patienten mit vaskulärer Demenz nach einmaliger Infusion von 50, 100 oder 200 mg EGb 761 oder Plazebo (Költringer *et al*, 1995) auf.

Die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation unter parenteraler Ginkgo biloba-Therapie (25 ml Ginkgo-biloba-Extrakt, Tebonin<sup>®</sup>) an 24 Patienten mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen konnte signifikant gegenüber der Plazebogruppe gesenkt werden (Költringer & Eber, 1989). Auch die Mikrozirkulation (gemessen an einer der vier Extremitäten durch Helium-Neon-Laser durch die Haut) von 30 Patienten mit artherosklerotischen Gefäßveränderungen konnte durch Einmalinfusion von 25 ml Ginkgo biloba-Extrakt (87,5 mg EGb 761, Tebonin<sup>®</sup>) deutlich gegenüber Plazebo verbessert werden (Koltringer *et al*, 1989).

Hämorheologische Veränderungen, wie veränderte Erythrozyten-Verformbarkeit und gesteigerte Erythrozytenaggregierfähigkeit, sind in vaskulären Erkrankungen mit verschlechterter Mikrozirkulation beobachtet worden. Einmalgabe von Kaveri<sup>®</sup> (45 ml Lösung, welche 112,5 mg Extrakt - standardisiert auf 27% Flavonglykoside und 6 % Terpenlaktone - entsprach) an 10 gesunde Probanden (einfachblind, crossover) konnte die Blutviskosität und Erythrozytenaggregierfähigkeit gegenüber der Plazebogruppe reduzieren (Jung *et al*, 1990). Eine signifikante Verbesserung der Blutviskosität und

---

Erythrozytenverformbarkeit mit einhergehender Symptombesserung konnte an 27 Patienten mit unterschiedlichen zerebralen Durchblutungsstörungen (Symptome: Kopfschmerzen, Schwindel, Tinnitus) durch eine 30-Tage-Behandlung mit Teboka<sup>®</sup> forte (2 x 40mg EGb 761/Tag bzw. 3 x 40 mg EGb 761/Tag) gezeigt werden (Erdinler *et al*, 1996).

In einer Studie an Patienten mit Claudicatio intermittens konnte durch Akutgabe von Ginkgo biloba-Extrakt (35 mg EGb 761) intravenös gegenüber Plazebo eine Verlängerung der Belastbarkeit infolge verbesserter Perfusion der minderdurchbluteten Bezirke erreicht werden (Rudofsky, 1987). Ähnliche Befunde zeigt eine 6-monatige Studie anhand signifikanter Überlegenheit von Ginkgo biloba-Extrakt (3 \* 40 mg EGb 761, Rökan<sup>®</sup>) im Vergleich zu Plazebo bezüglich schmerzfreier und maximaler Gehstrecke sowie Plethysmographie-Messungen (Bauer, 1984).

Eine Meta-Analyse von Pittler *et al.* schlußfolgert aus acht randomisierten Studien, daß Ginkgo biloba-Extrakt der Plazebo-Behandlung in der symptomatischen Therapie der Claudicatio Intermittens überlegen sei. Allerdings sei der Behandlungseffekt moderat und in der klinischen Relevanz unsicher (Pittler & Ernst, 2000).

#### 1.8.2.3 Klinische Studien zu EGb 761 in neurosensorischen Störungen / Tinnitus

Ginkgo biloba Trockenextrakt ist - laut Bundesanzeiger - auch für die Therapie des Tinnitus indiziert. Die klinischen Studien zeigen widersprüchliche Befunde. Eine 1986 durchgeführte randomisierte, doppelblinde Multicenter-Studie an 103 Tinnitus-Patienten zeigte eine signifikant bessere und schnellere Verminderung der Tinnitus-Symptome bei durch EGb 761 (2 \* 2 ml Tanakan, 3 Monate) behandelten Patienten gegenüber Plazebo (Meyer, 1986b). Der Nutzen von EGb 761 wird auch in einer vergleichenden, randomisierten Multicenter-Studie an 259 Patienten mit Tinnitus gezeigt (Meyer, 1986a).

Im Gegensatz zu den o.g. positiven Befunden zeigt eine erst kürzlich erschienene Studie (Drew & Davies, 2001) an etwa 1000 Probanden keinen Unterschied zwischen der Behandlung mit Ginkgo-Extrakt (3 \* 50 mg LI 1370, 12 Wochen) und Plazebo in bezug auf subjektives Empfinden von Lautstärke und Lästigkeit des Tinnitus.

Eine Übersichtsarbeit von Ernst & Stevinson zum Nutzen von Ginkgol biloba bei Tinnitus zeigt die schlechte Datenlage zu qualifizierten klinischen Studien. Zur Beurteilung der

---

Wirksamkeit von *Ginkgo biloba* in der Behandlung von Tinnitus fehlen zur Zeit noch einheitliche Kriterien bezüglich Klassifizierung von Patienten, Bestimmung von Endpunkten klinischer Meßparameter und methodische Übereinkünfte in der Durchführung klinischer Studien (Ernst & Stevinson, 1999).

## 1.9 Toxizität und Sicherheit von EGb 761 enthaltenden Präparaten

Akute und chronische Studien zur Toxizität von Extrakten aus *Ginkgo biloba*-Blättern zeigten gute Verträglichkeit mit einem großen Sicherheitsfaktor. Der orale LD<sub>50</sub> –Wert in der Maus lag bei 7,73 g/kg, in der Ratte bei über 10 g/kg. Nach intravenöser Gabe lagen die LD<sub>50</sub> - Werte bei ungefähr 1,1 g/kg in Maus und Ratte, nach intraperitonealer Gabe bei 1,9 g/kg in der Maus und 2,1 g/kg in der Ratte. In Langzeit-Toxizitätsstudien an der Ratte über 27 Wochen in einer Dosierung bis zu 500 mg/kg und an Hunden über 26 Wochen bis zu einer Dosis von 400 mg/kg ergaben sich durch die Administration von *Ginkgo*-Extrakt keine signifikant toxischen Effekte (histologisch, biologisch oder hämatologisch). Die orale, tägliche Verabreichung von 100 – 1600 mg/kg an Ratten und 100 – 900 mg/kg an Hasen zeigten keine teratogenen oder karzinogenen Effekte und beeinträchtigte auch nicht die Reproduktionsfähigkeit. Verschiedene Mutagenitätstests zeigten keine mutagene Aktivität (van Beek *et al.*, 1998). Daß immunotoxische Effekte auftreten können, wenn nicht genügend auf konstante, validierte Extraktzusammensetzung geachtet wird, zeigt ein Versuch in einem Lymphknoten-Assay mit einem nicht aufgereinigten Blätterextrakt aus *Ginkgo biloba* (Koch *et al.*, 2000). Für diese immunotoxischen Effekte und allergische Reaktionen nach Kontakt mit verschiedenen Teilen des *Ginkgo biloba*-Baumes werden Alkylphenole, wie Ginkgolsäuren, verantwortlich gemacht. Daß Ginkgolsäuren in konzentrationsabhängiger Weise auch neuronalen Zelltod (Apoptose und Nekrose) auszulösen vermögen, zeigen Ahlemeyer *et al.* (Ahlemeyer *et al.*, 2001). Diskutiert wird eine Aktivierung der Protein-Phosphatase-2C. Wegen der allergenen und genotoxischen Effekte der Ginkgolsäuren sieht die Extrakt-Monographie der Kommission E eine Grenze des Gehaltes von < 5 ppm vor.

## 1.10 Pharmakokinetik im Menschen

Die Datenlage zur Pharmakokinetik von *Ginkgo biloba*-Extrakt im Menschen ist bisher relativ schlecht. Die Flavonglykosid-Aglykone Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin wurden nach oraler Gabe von 400 mg EGb 761 an gesunde Probanden (nach 3 Tagen Flavonoid-freier

---

Diät) rasch absorbiert und erreichten nach 30 Minuten die maximalen Plasmaspiegel. Die Plasma-Halbwertszeit betrug 3 Stunden (Drieu *et al.*, 1985). Eine Studie von Fourtillan *et al.* (Fourtillan *et al.*, 1995) untersuchte die Pharmakokinetik von Ginkgolid A, B und Bilobalid in gesunden jungen Probanden nach oraler und intravenöser Einmalgabe von EGb 761. Die Bioverfügbarkeit  $F_{AUC}$  von Ginkgolid A, B und Bilobalid nach oraler Nüchtern-Gabe war mit  $0,80 (\pm 0,09)$ ,  $0,88 (\pm 0,21)$  bzw.  $0,79 (\pm 0,30)$  relativ hoch.

## **1.11 Vorstellung eines *in vitro*-Modells im Sinne eines geeigneten Surrogatparameters für die Wirksamkeit des Ginkgo-Extraktes**

Im multizellulären Organismus besteht eine Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod. Obwohl vieles über die Kontrolle der Zellproliferation bekannt ist, bleibt die Kontrolle des Zelltodes (Apoptose) weitgehend unklar. In den letzten Jahren hat es mehr und mehr Hinweise gegeben, daß reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) eine wichtige Rolle in der Ereignis-Kaskade spielen, die zum neuronalen Zelltod führt. Ginkgo biloba zeigt u.a. antioxidative und antiapoptotische Eigenschaften. Ein potentieller Ansatz für ein pharmakodynamisches Modell zum Vergleich Ginkgo biloba-haltiger Extrakte könnte die Messung quantitativer Unterschiede in Apoptose-Assays sein.

### **1.11.1 Definition der Apoptose**

Zelltod kann nach zwei verschiedenen Mechanismen ablaufen: Apoptose oder Nekrose. Die frühen biologischen Ereignisse, die die Art des Zelltodes bestimmen, sind bis jetzt unklar. Nekrose („accidental“ cell death) ist der pathologische Prozeß als Antwort auf einige Streß-Bedingungen oder nach Exposition toxischer Agentien. Es ist - relativ gesehen – ein passiver Prozeß, der mit rascher intrazellulärer ATP-Depletion einhergeht. Morphologisch wird Nekrose charakterisiert durch einen dramatischen Zuwachs des Zellvolumens (swelling) und Ruptur der Plasmamembran, was ein Ausfließen der zellulären Bestandteile in das Interzellular-Milieu zur Folge hat. Der Ausfluß dieser Intrazellular-Bestandteile der sterbenden Zelle in das Extrazellular-Volumen kann weiteren Gewebeschaden durch Beeinträchtigung der Nachbarzellen oder durch Anlocken proinflammatorischer Zellen an den Ort der Schädigung bewirken. Nekrose geht im Gegensatz zur Apoptose häufig mit starken Entzündungsprozessen einher.

---

Apoptose („normal“ or „programmed“ cell death) ist ein physiologischer Prozeß zur Beseitigung unerwünschter und unnützer Zellen während der Entwicklung und anderer biologischer Prozesse (Zellerneuerung, Gewebeumstrukturierung etc.). Gleichzeitig ist es eine Form des Zelltodes, die während vieler pathologischer Situationen in vielzelligen Organismen auftritt. Apoptose ist ein komplexer Prozeß, der morphologisch gesehen durch Zellschrumpfung (cell shrinkage), Chromatin-Kondensation, internukleosomale DNA-Fragmentation und Bildung von apoptotischen Körperchen (apoptotic bodies) beschrieben werden kann. Die apoptotischen Körperchen werden rasch vom Immunsystem erkannt und von Makrophagen oder benachbarten epithelialen Zellen phagozytiert. *In vitro* kann durch das Fehlen von phagozytierenden Zellen Sekundärnekrose (secondary necrosis) auftreten. Einige Protease-Familien sind in den Prozeß der Apoptose involviert: die prominenteste ist die der Caspasen. Caspasen sind Cystein enthaltende, Aspartat-spezifische Proteasen, welche als Zymogene gelöst im Zytoplasma, in mitochondrialen Zwischenmembran-Raum und in der Kernmatrix beinahe aller Zellen zu finden sind. Es werden mindestens drei Modelle für die Caspase-Aktivierung und damit der Initiierung der Apoptose beschrieben.

1. Apoptose kann induziert werden durch Bindung entsprechender Liganden an Zelloberflächen-Rezeptoren wie Fas oder TNF, auch Todes-Rezeptoren genannt. Dieser Vorgang ist nahezu ausschließlich durch Caspasen kontrolliert. Die Ligandenbindung an die Rezeptoren ruft eine Ansammlung von einer Reihe von Proteinen, die auch als DISC (Death-Inducing Signaling Complex) bezeichnet werden, welche dann eine Vorstufe der Caspasen (Procaspasen) aktiviert. Die nachfolgenden Prozesse deuten daraufhin, daß Caspasen in einer Kaskade arbeiten: Caspase-8 aktiviert Caspase-3, welche andere Caspasen aktiviert und letztendlich zur Spaltung von verschiedenen Substraten führt. Eines dieser Substrate ist die Caspase-abhängige Endonuklease, welche durch die Caspase-3 von ihrem Inhibitor im Cytosol befreit wird, und nachfolgend in den Kern wandert und dort die DNA in oligonukleosomale Bruchstücke von ca. 180 Basenpaaren spaltet.

2. Eine andere Art der Caspasen-Aktivierung wird für viele Agentien angenommen, die Apoptose induzieren und dabei jedoch nicht über Zelloberflächen-Rezeptoren fungieren. Fokus dieses Mechanismus sind dabei die Mitochondrien. Man vermutet, daß die während der Apoptose auftretende mitochondriale Dysfunktion die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol bewirkt, wo es an Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1), einem Säugetier-Homolog des proapoptotischen Nematoden-Protein ced-4, bindet. Apaf-1

---

enthält Bindungsstellen für Cytochrome C und dATP und oligomerisiert mit anderen Apaf-1-Proteinen. Dieser Komplex, Apoptosom genannt, bindet mit Hilfe der CARD (Caspase Recruitment Domain) des Apaf-1 Pro-Caspase-9. Aktive Caspase-9 wird von dem multimeren Komplex freigesetzt und aktiviert die mehr distalen Caspasen 3 und 7.

3. Caspasen können durch zytotoxische Zellen aktiviert werden. Perforin und Granzym B arbeiten bei der Induktion der Apoptose in Tumorzellen und anders infizierten Zellen synergistisch: Perforin macht die Zellen permeabel, wodurch das Granzym B in das Zytoplasma gelangt. Dort aktiviert es die Caspase-3.

Unabhängig vom Mechanismus der Aktivierung spalten Caspasen eine Vielzahl zellulärer Proteine, einschließlich PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) und Fodrin. Bis jetzt sind nahezu 100 zelluläre Proteine als potentielle Caspase-Substrate während der Apoptose identifiziert. Die meisten Schritte in der Apoptose-Kaskade benötigen Caspase-vermittelte proteolytische Aktivität.

### **1.11.2 Apoptose und oxidativer Streß**

Das intrinsische Gleichgewicht zwischen Leben und Tod kann durch viele äußere Faktoren beeinflusst werden. Reaktive Sauerstoff-Produkte zählen zu den potentesten und allgegenwärtigsten Bedrohungen eines lebenden Organismus. Intrazelluläre Akkumulation reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) wie Superoxid-Anionen, Hydrogenperoxide, Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikale und Peroxylradikale, kann aus toxischen Ereignissen oder normalen metabolischen Prozessen erwachsen. ROS können das natürliche antioxidative Abwehrsystem der Zelle durcheinanderbringen, was zu einer Schädigung der großen Klasse biologischer Makromoleküle, einschließlich Nucleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide, führt.

Oxidativer Streß wird definiert als Ungleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien, welches möglicherweise zu Zellschädigungen führt. Er ist involviert in einige biologische und pathologische Prozesse wie das Altern, Entzündungsgeschehen, Karzinogenese, Ischämie-Reperfusion und Erkrankungen wie AIDS, Parkinson, Huntington, familiäre amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und grauer Star. Auch Apoptose wird mit diesen

---

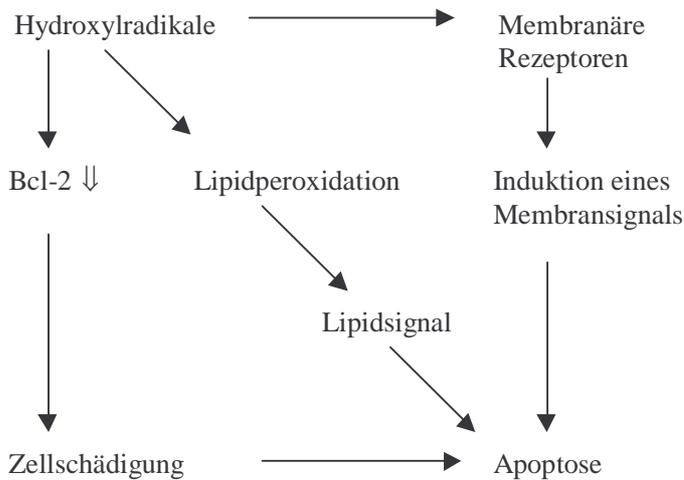
Erkrankungen in Verbindung gebracht, so daß beide Prozesse, oxidativer Streß und Apoptose, möglicherweise in die Pathogenese involviert sind.

Die Bedeutung von oxidativem Streß für die Apoptose hat sich anhand verschiedener, unabhängiger Beobachtungen abgezeichnet. Viele Jahre lang glaubte man, daß direkte Behandlung von Zellen mit Oxidativa wie Hydrogenperoxid oder Redox-aktiven Quinonen ausschließlich Nekrose verursache. Neuere Untersuchungen haben ergeben, daß niedrigere Dosen dieser Agentien Apoptose verursachen können. Außerdem führt intrazelluläre ROS-Bildung zu Apoptose. ROS-Produktion scheint auch die durch Bestrahlung und Chemotherapeutika verursachte Toxizität zu determinieren. Entleerung von Glutathion (GSH)-Speichern ist wohl auch ein Teil der Todesmaschinerie und geht mit ROS-Produktion während der Apoptose in relevanten Systemen einher. Die Fähigkeit verschiedener zellulärer Antioxidantien, wie Katalase und N-Acetylcystein (NAC), die Apoptose zu inhibieren, die durch andere Agentien als Oxidantien induziert worden ist, spricht für eine zentrale Rolle des oxidativen Stresses in der Apoptose. Für ein breites Spektrum antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und das Bakulovirus-Protein p53 sind antioxidative Funktionen beschrieben worden, was wiederum die These unterstützt, daß ROS-Generierung ein wesentliches Merkmal der Apoptose ist (Chandra *et al.*, 2000).

### **1.11.3 Antiapoptotische / antioxidative Eigenschaften des EGb 761**

Viele Befunde zeigen, daß EGb 761 bzw. einige seiner Inhaltsstoffe antioxidative Wirksamkeit besitzen (s. Kapitel 1.8.1). EGb 761 weist aber auch antiapoptotische Eigenschaften auf, die teilweise auf seine antioxidativen Fähigkeiten zurückzuführen sind.

An Versuchen mit zerebralen Zellen, bei denen Apoptose durch Hydroxylradikale induziert wurde, konnte gezeigt werden, daß EGb 761 (100 µg/ml) apoptoseprotektiv wirkt (Ni *et al.*, 1996). Eine Untersuchung über die Apoptose-Signal-Wege bei Induktion durch Hydroxylradikale an zerebralen Zellen und über den Einfluß von EGb 761 zeigt eine Arbeit von Xin (Xin *et al.*, 2000). Die Terpenlaktone-Fraktion schützt nicht gegen durch Hydroxylradikale induzierte Apoptose, was Xin *et al.* im Unvermögen des direkten Hydroxylradikal-Fangens durch die räumliche Struktur der Terpenlaktone begründet sehen (cage-like structure). Folgendes Schema zu den Apoptose-Signal-Wege wird etabliert:



EGb 761 soll diese Signalwege auf unterschiedliche Arten und mit Hilfe unterschiedlicher Inhaltsstoffe beeinflussen.

Die durch Serumentzug bzw. Staurosporin induzierte Apoptose an neuronalen Zellen konnte durch EGb 761 und einige seiner Inhaltsstoffe (Ginkgolide und Bilobalid) reduziert werden. Bilobalid (1-100  $\mu\text{M}$ ) erwies sich als der potenteste Inhaltsstoff bezüglich der antiapoptotischen Kapazität (Ahlemeyer *et al*, 1999). Auch an retinalen Zellen der Ratte konnten die antiapoptotischen / zellprotektiven Eigenschaften des Ginkgo biloba belegt werden. Lichtinduzierte neuronale Degeneration in der Retina konnte durch Vorbehandlung von Ratten mit EGb 761 verhindert werden. Die Zahl der apoptotischen Nuclei nahm in der mit EGb 761 behandelten Gruppe signifikant ab (Ranchon *et al*, 2001).

Eine *ex vivo*-Studie von Schindowski *et al.* (Schindowski *et al*, 2001) zeigt, daß eine Behandlung von Mäusen (100 mg/kg KG p.o.) über zwei Wochen T-Lymphozyten aus der Milz vor D-Ribose-induzierter Apoptose zu schützen vermag (insbesondere T-Zellen von älteren Mäusen).

Basierend auf den beschriebenen antiapoptotischen Eigenschaften des Ginkgo biloba kann man sich *in vitro*-Versuchsansätze denken, in denen diese Effekte in Apoptose-Assays an verschiedenen Zellarten und -systemen quantifiziert werden. Vorausgesetzt diese Ansätze sind sensitiv genug und haben etwas mit der Wirksamkeit von Ginkgo biloba zu tun (z.B. Korrelation mit Plasmaspiegeln), lassen sich daraus eventuell pharmakodynamische Modelle entwickeln.

---

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Vergleich der pharmazeutischen Qualität Ginkgo biloba-haltiger Fertigpräparate

##### 2.1.1.1 Geräte und Materialien

Autosampler, Typ Jasco AS-950 Intelligent Sampler, Firma Jasco, D-64823 Großumstadt

Bidestillationsanlage, Typ Destamat Bi 18E, Firma Heraeus Quarzglas, D-63801 Kleinostheim

Brechungsindex-Detektor, Typ Jasco RI-930 Intelligent RI Detector, Firma Jasco, D-64823 Großumstadt

Chromatogramm-Auswertesoftware, Borwin V1.21.60, Firma JMBS Developements, Grenoble

Einmal-Untersuchungshandschuhe, Latex, Firma Ansell GmbH, D-81829 München

Filterhalter Selectron<sup>®</sup> aus Polysulfon für Spritzen, Schleicher und Schüll, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Ganzglas-Spritze, Luer-Lock-Metallkonus, Poulten Graf, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Glasfaser-Mikrofilter, Typ GF/D 25mm, Whatman, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Gradienten-Mischer, Typ Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit, Firma Jasco, D-64823 Großumstadt

HPLC-Pumpe, Typ Jasco PU-980 Intelligent HPLC-Pump, Firma Jasco, D-64823 Großumstadt

Hydrolyseröhrchen (Spezialanfertigung) mit Deckel, Firma Schott, D-55122 Mainz

Mehrfach-Magnetrührer, Typ Poly 15, H + P Labortechnik, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Online-Entgasungsgerät, Typ Jasco DG-1580-53 3-Line Degasser, Firma Jasco, D-64823 Großumstadt

pH-Meter, Typ CG 825, Firma Schott, D-65719 Hofheim

PP-Röhrchen 15 ml und 50 ml, Cellstar<sup>®</sup>, Firma Greiner Labortechnik, D-72636 Frickenhausen

Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil<sup>®</sup>, Typ 109.000-QS, Schichtdicke 10mm, Hellma, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Rotationsverdampfer, Firma Vacuubrand, D-6980 Wertheim

Säulenthermostat, Typ BF 0-04 1smosf, Firma W.O. Electronics, A-2103 Langenzersdorf

Schüttler, Typ REAX 2000, Heidolph, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Ultraschallbad, Typ Sonorex Super RK 510 H, Bandelin, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

UV-Detektor, Typ Jasco UV-975 Intelligent UV/VIS Detector, Firma Jasco, D-64823 Großumstadt  
UV/VIS-Photometer, Typ U-2000 Spectrophotometer, Firma Hitachi, D-40547 Düsseldorf  
Verschlußfolie Parafilm<sup>®</sup> M, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Vollpipetten, 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 4; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 50 ml, Blaubrand<sup>®</sup>, Brand, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Waage, Typ Mettler AT 261 DeltaRange<sup>®</sup>, Firma Mettler-Toledo, D-35396 Gießen  
Wasserbad, Typ Thermomix 1441, Firma B.Braun-Melsungen, D-40595 Düsseldorf  
Wasserbad, Typ 1003, GFL, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Wirkstoff-Freigabe-Prüfgerät, Typ Pharma Test PTW S, Firma Pharmatest Apparatebau, D-63512 Hainburg  
Zentrifuge, Typ GS-6R Centrifuge, Firma Beckman, D-47807 Krefeld

### 2.1.1.2 Chemikalien

Acetonitril, Roti<sup>®</sup> solv HPLC, Firma Roth, D-76185 Karlsruhe  
Amentoflavon, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Benzylalkohol, Arbeitsstandard, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Bilobalid, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Bilobetin, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Citronensäure-Monohydrat, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Eisessig, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Ethylacetat, LiChrosolv<sup>®</sup>, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Extrelut<sup>®</sup> NT 20, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Ginkgetin, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Ginkgolid A, B und C, Referenzsubstanzen, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Ginkgolsäuren, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Ginkgo biloba-Standardextrakt EGb 761, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Isoginkgetin, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Isopropanol, LiChrosolv<sup>®</sup> Gradient Grade, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Kämpferol, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Kaliumdihydrogenphosphat, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Methanol, Rotisol<sup>®</sup> HPLC Gradient Grade, Firma Roth, D-76185 Karlsruhe  
Natriumacetat-Trihydrat, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Ortho-Phosphorsäure 85%, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Quercetin-Dihydrat, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Rutin (Quercetin-3- rutinosid), Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Salzsäure rauchend 37%, reinst, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Sciadopytisin, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Ultraschall-Bad, Sonorex, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Wasser, bidestilliert

## 2.1.1.3 Amerikanische Ginkgo biloba-haltige Fertigpräparate

Die Präparate wurden aus verschiedenen Läden in den USA rekrutiert, mit der Absicht, den Markt möglichst repräsentativ und randomisiert abzubilden. Folgende Präparate standen für die Untersuchungen zur Verfügung:

<b>Nr.</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Präparatename</b>	<b>Chargen-Nr.</b>
1	Albertsons	Ginkgo Biloba	7E01703
2	Bayer	One a day Memory & Concentration	8E03056 8E03057
3	Celestial Seasonings	Ginkgo Biloba	010403A
4	Dayton Hudson Corporation	Target Ginkgo Biloba	8D05413
5	Fields of Nature	Ginkgo Biloba	4801791
6	General Nutrition Corporation	Natural Brand Ginkgo Biloba	71047
7	Health Care Naturals	Ginkgo Extract	802241P
8	Leiner Health Products	Your Life Ginkgo Biloba	8E01499 8E01516
9	Nature Made Nutritional Products	Ginkgo Biloba	HJ12478
10	Nature´s Bounty	Ginkgo Biloba	4136812
11	Nature´s Resource Products	Nature´s Resource Ginkgo Biloba	IF13085
12	Nature´s Way Products	Ginkgold	808169 902527 908415 908416
13	NaturPharma	Spring Valley Ginkgo Biloba	8C04774
14	NaturPharma	Spring Valley Ginkgo Extract	801051A
15	Now Foods	Now Ginkgo Biloba	70564 74678P1
16	Pharmanex	BioGinkgo 24/6	610004 610025 610053

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Präparatename	Chargen-Nr.
17	Pharmanex	BioGinkgo Extra Strength 27/7	610040 610059 AH25391
18	Pharmaton	Ginkoba	FD6061A FD7276A FD8404A FD9462A
19	Rite Aid	Ginkgo Biloba	62374 8A03130 8D03390 8E05528
20	Solgar Laboratories	Super Ginkgo	4802
21	Sundown Vitamins	Sundown Herbals Ginkgo Biloba	4144 6223
22	Sundown Vitamins	Sundown Herbals Ginkgo Biloba (Whole Herb)	4428 6331
23	Trader Joe´s	Trader Darwin´s Ginkgo Biloba	2794-J8
24	Walgreens	Ginkgo-Memo	IE11086 IF10313 IG11014 IG11015 II10812
25	Warner-Lambert	Quanterra	8F5010
26	Whitehall-Robins Healthcare	Centrum Herbals Ginkgo Biloba	457-569 458-490 458-785 458-790 461-200 461-203
27	Whole Foods Market	Ginkgo Biloba	T4676E04
28	Whole Foods Market	Ginkgo Biloba 27/7	7287

---

## 2.1.2 *In vitro* -Versuche an verschiedenen Zellkultursystemen

### 2.1.2.1 Geräte und Materialien

Analysis computer Power Macintosh 7600/132, Firma Apple Macintosh, Cupertino, California

CellQuest™ analysis software, Firma Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg

CO<sub>2</sub>-Inkubatoren Heraeus, Typ BB 6220, Firma Heraeus Instruments GmbH, D-63450 Hanau

Deckgläser für Haemocytometer, Superior, Firma Merck Eurolab GmbH, 60487 Frankfurt

Einmal-Untersuchungshandschuhe, Latex, Firma Ansell GmbH, D-81829 München

ELISA-Reader Digiscan G 010150 D, Firma Asys Hitech GmbH, A-5301 Eugendorf

FACS Calibur™, Fluorescence activated cell sorter, Firma Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg

FACSCComp™ software, Firma Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg

Inverses Mikroskop, Modell TMS, Typ I04, Nikon, Japan

Jurkat-Zelllinie

Kulturschalen Corning® 25 cm<sup>2</sup>, Polystyren (tissue culture treated), Firma Dunn Labortechnik GmbH, D-53567 Asbach

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Firma Heraeus Instruments GmbH, D-63450 Hanau

Mikrotiterplatten IWAKI, 96 well mit flachem Boden, Firma Dunn Labortechnik GmbH, D-53567 Asbach

MikroWIN Vers. 3.0, Auswertesoftware, Mikrotek Laborsysteme GmbH, D-51491 Overath

Monovette®, NH<sub>4</sub>-Heparin 9 ml, Firma Sarstedt, D-51588 Nümbrecht

Multifly® Kanülen-Set 21G, 0,8 mm, Schlauch 30 cm, Firma Sarstedt, D-51588 Nümbrecht

Multipette® plus 4981, Eppendorf, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Neubauer Zählkammer Superior, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

PBML (peripheral blood mononuclear lymphocytes), human

PC-12 Zelllinie

Pipettierhelfer, pipetus®-akku, Hirschmann, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Plastibrand® Tip-Rack, 5 – 300 µl, Brand, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Pipetten Modelle Pipetman 10, 20, 200, 1000 und 5000 µl, Firma Abimed, D-40764 Langenfeld

Pipette mit Spitze, 5, 10 und 25 ml, einzeln verpackt, Firma Greiner Labortechnik, D-72636 Frickenhausen

Platte für Suspensionskultur, U-Form, steril, Abdeckplatte, Firma Greiner Labortechnik, D-72636 Frickenhausen

PP-Röhrchen 15 ml und 50 ml, Cellstar®, Firma Greiner Labortechnik, D-72636 Frickenhausen

Schüttler, Typ REAX 2000, Heidolph, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Transferpette®-8, 10 - 100 µl, Brand, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Transferpette®-8, 30 - 300 µl, Brand, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Waage, Typ Mettler AT 261 DeltaRange®, Firma Mettler-Toledo, D-35396 Gießen

### 2.1.2.2 Chemikalien

7-Aminoactinomycin D (7-AAD), Firma Moleculare Probes, Leiden, Niederlande  
Beta-Amyloid A $\beta$  25-35, Firma Bachem Biochemica GmbH, D-69126 Heidelberg  
Bilobalid, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
CellWash<sup>®</sup>, Firma Becton Dickinson, D-69126 Heidelberg  
Cell Proliferation Kit I (MTT), Boehringer Mannheim, Firma Roche Diagnostics, D-68305 Mannheim  
Desoxy-D-Ribose, Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim  
Dimethylsulfoxid, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Dimethylformamid, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Dulbecco's Mem with Glutamax-I, with 4500 mg/l Glucose, with Pyridoxine, without sodium pyruvate, GibcoBRL, Firma Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe  
Ficoll separating solution Seromed<sup>®</sup>, Firma Biochrom KG, D-12247 Berlin  
Fötale Rinderserum, GibcoBRL, Firma Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe  
Ginkgo-biloba-Standardextrakt EGb 761, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Ginkgolid A, B und C, Referenzsubstanzen, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Kämpferol, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
PBS, Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline, GibcoBRL, Firma Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe  
Propidium-Iodid, Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim  
RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I, with 25MM HEPES, GibcoBRL, Firma Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe  
Quercetin-Dihydrat, Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
Rutin (Quercetin-3- rutinosid), Referenzsubstanz, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe  
SDS (sodium dodecylsulfate) 4x, Firma Gerbu Biotechnik GmbH, D-69251 Gaiberg  
Staurosporin, Firma ALEXIS DEUTSCHLAND GmbH, D-35305 Grünberg  
Tetrahydrofuran, LiChrosolv<sup>®</sup>, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Trinatriumcitrat-Dihydrat, zur Analyse, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt  
Triton-X-100, Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, D-89552 Steinheim  
Trypan-Blau 0,4%, GibcoBRL, Firma Life Technologies GmbH, D-76131 Karlsruhe  
Wasser, bidestilliert

### 2.1.2.3 Spezielle Ginkgo-biloba-Extraktfraktionen

Die Extraktfraktionen 1-7 (s. Tab. 3) wurden durch Extraktion mit wäßrig-ethanolischen Lösungsmitteln verschiedener Mischungsverhältnisse hergestellt. 50 g EGb 761 Ch. Nr. 1986 wurden auf 7 l DIAION HP 20 (131 x 8 cm) getrennt und jeweils mit 25 l Lösungsmittel eluiert. Jede Fraktion wurde über den Gehalt an Terpenlaktone und die Anwesenheit von Flavonglykosiden charakterisiert.

**Tab. 3:** Charakterisierung der Extraktfraktionen 1 - 7

<b>Elutionsmittel</b>	<b>Fraktion Nr.</b>	<b>Menge (g)</b>	<b>Menge (Massen-%)</b>	<b>Terpenlaktone (Massen-% der jew. Fraktion)</b>	<b>Nachweis von Flavonen</b>
Wasser	1	3,80	8,1	0	nein
5 % EtOH	2	5,52	11,7	0	nein
10 % EtOH	3	3,00	6,4	0	nein
20 % EtOH	4	3,04	6,4	0	nein
40 % EtOH	5	24,35	51,6	9	ja
50 % EtOH	6	5,86	12,4	4	ja
96 % EtOH	7	1,63	3,5	0	nein
Summe		47,2	100,0		

### 2.1.3 Bioverfügbarkeitsstudie zweier amerikanischer Ginkgo biloba-Präparate

#### 2.1.3.1 Geräte und Materialien

Gefrierschrank Sanyo, MDF-U5186 S

Gefriertruhe GTS 3163

Kühlzentrifuge Universal 32 R, Hettich

Kühlschrank Alaska KS 12550

Monovette<sup>®</sup>, NH<sub>4</sub>-Heparin 9 ml, Firma Sarstedt, D-51588 Nümbrecht

Pasteur-Pipetten, 1,0 und 3,0 ml, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Pipetten Modelle Pipetman 10, 20, 200, 1000 und 5000 µl, Firma Abimed,

D-40764 Langenfeld

Pipette Eppendorf Varipette Typ Research 3110, 500 – 5000 µl, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Pipettenspitzen, 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Plasmaröhrchen, Polypropylen, 13 ml, Firma Sarstedt, D-51588 Nümbrecht

Schüttler, Vortex-Genie, Firma Bender-Hobein, D-Bruchsal

Ultraschall-Bad, Sonorex, Bandelin, Firma Merck Eurolab, D-60487 Frankfurt

Vakuum-Konzentrator, Alpha-RVC, Firma Christ, D-37520 Osterode am Harz

Waage, Mettler AT20, Firma Mettler-Toledo, D-35396 Gießen

#### 2.1.3.2 Chemikalien

Bilobalid, Wo 106, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe

BSTFA (N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamide), Pierce, Rockford, USA

1-Ethoxy-Ginkgolid B, BN 50585, Wo 148, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe

Ethylacetat, p.a., Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Ginkgolid A, Bz 116, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe

Ginkgolid B, Bz 117, Firma Schwabe, D-76227 Karlsruhe

Humanplasma, DRK, D-76530 Baden-Baden

Methanol, p.a., Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Oasis<sup>™</sup> HLB Sorbens, 30 mg, Firma Waters, D-65760 Eschborn

Phosphorsäure 85 %, p. a., Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Salzsäure, conc., p.a., Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Salzsäure 1 N, Firma Merck Eurolab GmbH, D-60487 Frankfurt

Wasser, demineralisiert, Milli-Q plus, Millipore, Milford, USA

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Vergleich der pharmazeutischen Qualität Ginkgo biloba-haltiger Fertigpräparate

#### 2.2.1.1 Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen

Zur Überprüfung der Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen kann die massebezogene oder wirkstoffbezogene Dosierungsgenauigkeit bestimmt werden. Bei dem heutigen Stand der Technik ist in der Regel die Annahme gerechtfertigt, daß der Wirkstoffanteil in der Grundlage weitgehend homogen verteilt vorliegt. Dennoch sind im allgemeinen die Schwankungen des Wirkstoffgehaltes größer als die der Einzelmasse. So liegt bei großen Masseschwankungen immer der Verdacht einer Entmischung während der Verarbeitung nahe.

##### *2.2.1.1.1 Gleichförmigkeit der Masse einzeldosierter Arzneiformen nach Europäischem Arzneibuch EUAB 1997 bzw. nach USP 24*

Nach EUAB wurden 20 zufällig nach dem Stichprobenverfahren entnommene Einheiten oder - bei Zubereitungen in Einzeldosisbehältnissen - der Inhalt von 20 Behältnissen einzeln gewogen und deren Durchschnittsmasse errechnet. Bei höchstens 2 der 20 Einheiten durfte die Einzelmasse um einen höheren Prozentsatz, als in der Tab. 4 angegeben ist, von der Durchschnittsmasse abweichen, jedoch durfte bei keiner Einheit die Masse um mehr als das Doppelte dieses Prozentsatzes abweichen. Bei Kapseln wurde wie folgt verfahren: Eine Kapsel wurde gewogen. Ohne Bruchstücke der Kapselhülle zu verlieren, wurde die Kapsel geöffnet und ihr Inhalt möglichst vollständig entleert. Bei Weichgelatine-kapseln wurde die Kapselhülle mit Äther oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel gewaschen und so lange an der Luft stehengelassen, bis der Geruch des Lösungsmittels nicht mehr wahrnehmbar war. Die Kapselhülle wurde gewogen und die Masse des Inhalts als Differenz beider Wägungen errechnet. Mit weiteren 19 Kapseln wurde in gleicher Weise verfahren.

**Tab. 4:** Höchstzulässige Abweichungen von der Durchschnittsmasse in Prozent nach EUAB

Arzneiform	Durchschnittsmasse in Milligramm	Höchstzulässige Abweichung von der Durchschnittsmasse in Prozent
Nichtüberzogene Tabletten, Filmtabletten	80 oder weniger	10
	mehr als 80 und weniger als 250	7,5
	250 und mehr	5
Kapseln, nichtüberzogene Granulate und Pulver	weniger als 300	10
	300 und mehr	7,5

Vergleicht man die Kriterien für die Gleichförmigkeit der Masse nach EUAB mit denen der USP 24 (Weight variation of nutritional supplements), so sind die Vorgaben nach EUAB stringenter. Die Ergebnisse der Wägungen wurden auch nach den Vorschriften der USP 24 analysiert.

#### 2.2.1.1.2 Gleichförmigkeit des Gehaltes

❖ Fingerprint-Untersuchung des Musters von Ginkgoflavonglykosiden und anderen Inhaltsstoffen mit Hilfe der HPLC

Vor der Gehaltsbestimmung einzelner Inhaltsstoffgruppen - als weiteres Kriterium der pharmazeutischen Qualität eines Arzneimittels – wurde ein grobes Screening des Inhaltsstoffmusters der einzelnen Fertigpräparate durchgeführt. Fingerprint-chromatographische Verfahren bieten eine Charakterisierung der gesamten Bandbreite der Extraktbestandteile hinsichtlich der physikochemischen Eigenschaften wie Lipophilie und Molekülgröße, da hierbei durch eine Gradientenelution der gesamte Polaritätsbereich abgedeckt wird.

Es wurden jeweils 80 mg Extrakt entsprechende Mengen an zermörserter Tabletten- bzw. Kapselmasse (n=2) in Zentrifugengläser mit Schraubverschluß eingewogen, anschließend je viermal mit 6 ml Methanol für 10 min auf einem Mehrfach-Magnetrührer ausgerührt und nach Zentrifugation bei 4500 rpm (2054 g) für 10 min die Überstände in einem 25,0 ml Meßkolben gesammelt. Mit Methanol wurde dann auf 25,0 ml aufgefüllt und diese Lösung mit Hilfe der HPLC analysiert. Als Referenz wurde eine Eichgerade (Sechs-Punkt-Eichung)

mit einer Lösung Rutin in Methanol für die Bestimmung der Flavonglykoside, Amentoflavon in Methanol für die Bestimmung der Biflavone und Ginkgolsäuren in Methanol für die Bestimmung der Ginkgolsäuren aufgenommen.

Als Qualitätskontrolle diente Ginkgo biloba-Standardextrakt EGb 761 (n = 1), der wie die Proben aufbereitet wurde und dessen Gehalt an Flavonglykosiden, Biflavonen und Ginkgolsäuren bekannt ist.

Die Chromatographie wurde durchgeführt mit

- einer Säule von 0,125 m Länge und 4,0 mm innerem Durchmesser, gepackt mit octadecylsilyliertem Kieselgel zur Chromatographie (5 µm),
- einem Gradientenprogramm mit Eluens A und B bei einer Durchflußrate von 1,2 ml je Minute:

Eluens A (Wasser 99 VT, Acetonitril 1 VT, Phosphorsäure 85% 0,3 VT)

Eluens B (Acetonitril 100 VT, Phosphorsäure 85% 0,3 VT),

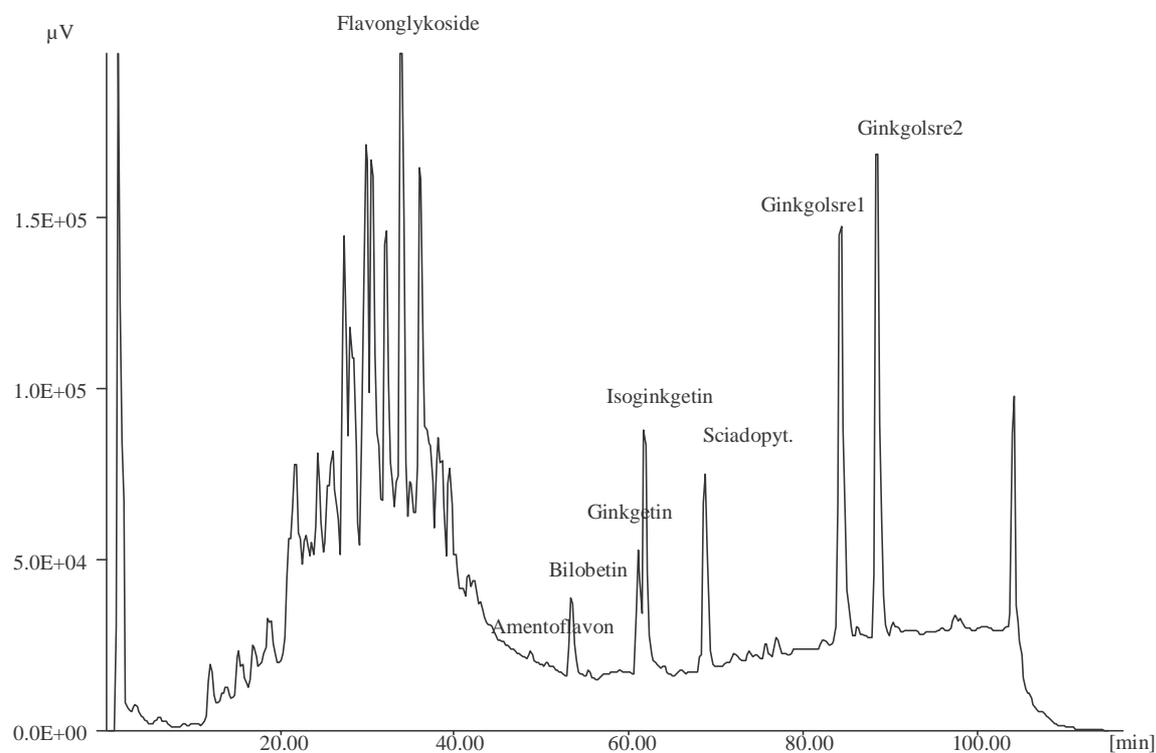
Zeit	Eluens A	Eluens B
5 min	100 %	0 %
50 min	60 %	40 %
45 min	1 %	99 %
15 min	100 %	0 %

- einem Spektrophotometer als Detektor bei zwei Wellenlängen:
  - 360 nm für die Bestimmung der Flavonglykoside und Biflavone und
  - 211 nm für die Bestimmung der Ginkgolsäuren und
- einer 20-µl-Probenschleife.

Das Gleichgewicht der Säule wurde mit der mobilen Phase bei einer Durchflußrate von 1,0 ml je Minute etwa 30 min lang eingestellt. 20 µl Referenz- bzw. Probenlösung wurden aufgrund der langen Laufzeit jeweils nur einmal analysiert.

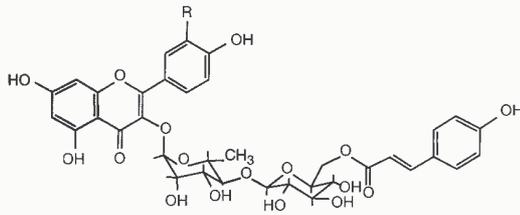
Im Rahmen der Auswertung der Flavonglykoside wurde die gesamte Fläche des Bereiches der Flavonglykoside (nicht getrennte Peaks / Gebirge, s. Abb. 2) ermittelt und auf die Rutin-Eichgerade bezogen. Die Flächen der einzelnen Peaks Amentoflavon, Bilobetin, Ginkgetin,

Isoginkgetin und Sciadopytisin wurden ermittelt und als Biflavone auf die Amentoflavon-Eichgerade bezogen. Genauso wurde mit den Ginkgolsäuren verfahren. Abb. 2 zeigt exemplarisch ein Fingerprint-Chromatogramm.



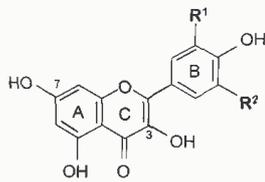
**Abb. 2:** Fingerprint eines Ginkgo biloba-haltigen Präparates, UV-Detektion 211 nm. Aufgetragen ist die Retentionszeit (x-Achse) gegen die Intensität des Detektorsignals gemessen in  $\mu\text{V}$  (y-Achse).

Bei anfänglich sehr polarem Fließmittel eluiert man zuerst die Flavonoide/Flavonglykoside (Strukturformeln s. Abb. 3 und 4), dann die Biflavone (Strukturformeln s. Abb. 5) und schließlich bei lipophilerem Fließmittel die Ginkgolsäuren (cis- und trans-Form) (Strukturformel s. Abb. 6). Die Flavonoide und Terpenlaktone sind relativ lipophil und nur wasserlöslich aufgrund des Vorhandenseins anderer Substanzen im Extrakt, die lösungsvermittelnd wirken. Diese lipophilen Eigenschaften der pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe ist wichtig für ihre Affinität zu biologischen Membranen und letztendlich zur Überwindung biologischer Barrieren.



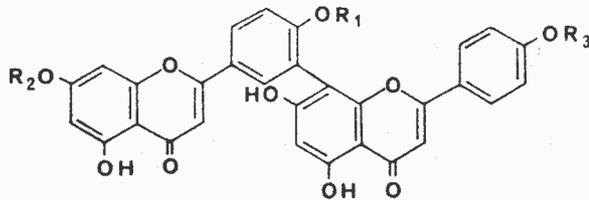
R = H: Kaempferol-3-o-(6'''-trans-p-coumaroyl-4''-glucosyl)rhamnoside  
 R = OH: Quercetin-3-o-(6'''-trans-p-coumaroyl-4''-glucosyl)rhamnoside

Abb. 3: Strukturformeln zweier Cumarylester von Flavonoldiglykosiden aus EGb 761



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
Kaempferol	H	H
Quercetin	OH	H
Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	H
Myricetin	OH	OH

Abb. 4: Strukturformel des Flavonolgrundgerüst



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Sciadopitysin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Ginkgetin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Isoginkgetin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
Bilobetin	CH <sub>3</sub>	H	H
Amentoflavon	H	H	H

Abb. 5: Strukturformeln der Biflavone

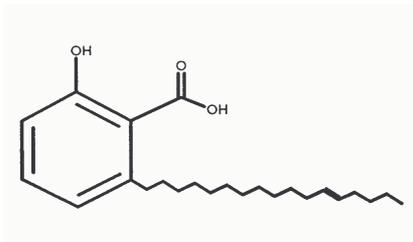


Abb. 6: Strukturformel der Ginkgolsäure

#### ❖ Gehaltsbestimmung der Flavonoide mit Hilfe der HPLC

Eine der pharmakologisch wichtigsten Inhaltsstoffgruppen im Ginkgo biloba-Blätterextrakt ist die der Flavonglykoside, deren antioxidative Eigenschaften zugesprochen werden. Der Gehalt an Flavonglykosiden wurde nach einer Methode aus der DAB 2000-Monographie „Eingestellter Ginkgotrockenextrakt“, die als EUAB-Vorschrift vorgeschlagen ist, bestimmt.

40 mg Extrakt entsprechende Mengen an Tabletten- bzw. Kapselmasse ( $n = 3$ ) wurden in einem 25-ml-Meßkolben mit 10 ml Methanol versetzt. Nach Zusatz von 7,5 ml Salzsäure 7% und 2,5 ml destilliertem Wasser wurde nach dem Abkühlen mit Methanol zu 25,0 ml verdünnt. 10 ml dieser Lösung wurden filtriert und in einem 10-ml-Braunglasfläschen, das gegen Glasbruch mit Kunststoff beschichtet und mit Hilfe eines Schraubdeckels mit eingelegter Butylkautschuk-Membran dicht verschlossen war, 25 min lang im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Anschließend wurde auf 20°C abgekühlt, und diese Lösung zur Messung in der HPLC verwendet.

Als Referenz wurde eine Eichgerade (6-Punkt-Eichung) von einer Lösung Quercetindihydrat in Methanol (60 VT)/Salzsäure 7% (30 VT)/Wasser (10 VT) aufgenommen. Als Qualitätskontrolle wurde für jeden einzelnen Versuchstag der Ginkgo-Standardextrakt EGb 761 ( $n=3$ ) mitlaufen gelassen, der wie die Proben hydrolysiert wurde und dessen Gehalt bekannt ist.

Die Chromatographie wurde durchgeführt mit

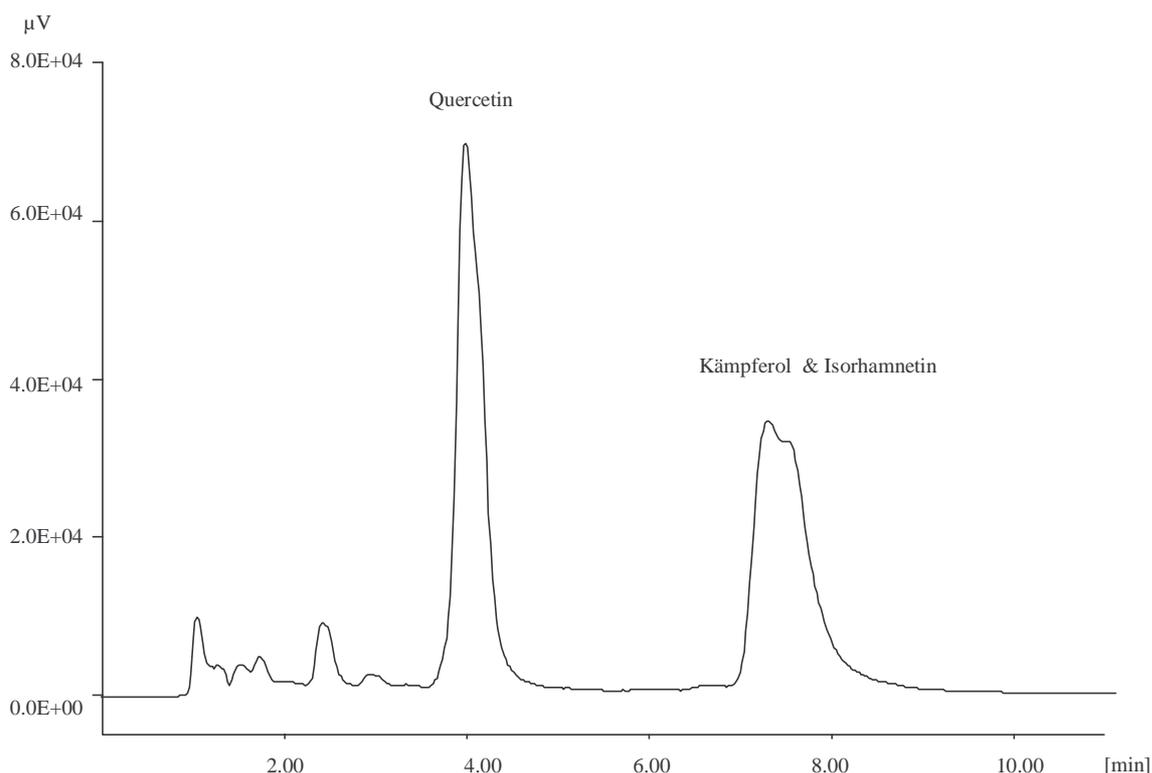
- einer Säule von 0,125 m Länge und 4,0 mm innerem Durchmesser, gepackt mit octadecylsilyliertem Kieselgel zur Chromatographie (5 $\mu$ m),
- einer Mischung von 5 Volumenteilen Isopropylalkohol, 47 Volumenteilen Acetonitril und 100 Volumenteilen einer Lösung von 6 g/l Citronensäure als mobile Phase bei einer Durchflußrate von 1,0 ml je Minute,

- 
- einem Spektrophotometer als Detektor bei einer Wellenlänge von 370 nm und
  - einer 10- $\mu$ l-Probenschleife.

Das Gleichgewicht der Säule wurde mit der mobilen Phase bei einer Durchflußrate von 1,0 ml je Minute etwa 30 min lang eingestellt. 10  $\mu$ l Referenz- bzw. Probenlösung wurden je zweimal eingespritzt.

Zur Auswertung wurden die Flächen des Quercetin- ( $t_R$  etwa 4 min), des Kämpferol- ( $t_R$  etwa 6,4 min) und des Isorhamnetin-Peaks ( $t_R$  etwa 6,4 – 7 min) addiert und in die Geradengleichung eingesetzt, die über die Eichung mit Quercetindihydrat erhalten wurde. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 2,514 multipliziert (wegen der Umrechnung in Flavonoidglykoside mit einer mittleren Molmasse von  $M_R = 756,7$ ) und der Prozentgehalt an Flavonoiden im Extrakt errechnet, indem auf 100 mg Extrakt hochgerechnet wurde (eingesetzt wurden nur 40 mg Extrakt entsprechende Mengen an Tabletten- bzw. Kapselmasse).

Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, liegen der Kämpferol- und Isorhamnetin-Peak aufgrund fast gleicher Polarität übereinander, so daß sie nicht getrennt integriert werden können. Da die Summe der Flächen der drei Peaks zur Berechnung herangezogen wird, spielt die Peaküberlagerung hier keine Rolle.



**Abb. 7:** Typisches Chromatogramm eines hydrolysierten EGb 761-Extraktes, UV-Detektion 370 nm

- ❖ Gehaltsbestimmung der Terpenlaktone mit Hilfe der HPLC nach der Monographie „Eingestellter Ginkgotrockenextrakt“ aus dem DAB 2000

Als weitere pharmakologisch wichtige Inhaltsstoffgruppe der Ginkgo-biloba-Blätterextrakte wurden auch die Terpenlaktone der einzelnen Präparate nach einer Methode der Monographie „Eingestellter Ginkgotrockenextrakt“ aus dem DAB 2000 quantifiziert.

80,0 mg Extrakt entsprechende Mengen an Tabletten- bzw. Kapselmasse ( $n = 3$ ) wurden in einem 25-ml-Becherglas in 10 ml Phosphat-Pufferlösung pH 5,8 unter Rühren (20 min) gelöst. Die Lösung wurde unter zweimaligem Nachwaschen mit je 5 ml Phosphat-Pufferlösung pH 5,8 auf ein Chromatographierohr, das mit Extrelut NT 20 (Kieselgur-Material) gefüllt wurde, aufgegeben. Nach 15-minütigem Stehenlassen wurde mit 100 ml Ethylacetat eluiert. Das Eluat wurde bei etwa 4 kPa im Wasserbad von 50 °C zur Trockne eingengt. Der Rest des Lösungsmittels wurde bei Raumtemperatur im Luftstrom entfernt, und der Rückstand in 2,5 ml mobiler Phase gelöst.

Als Referenz wurde eine Eichgerade (Sechs-Punkt-Eichung) mit Benzylalkohol, gelöst in mobiler Phase, vermessen. Als Qualitätskontrolle wurde für jeden einzelnen Versuchstag der

---

Ginkgo-Standardextrakt EGb 761 ( $n = 3$ ) mitlaufen gelassen, der wie die Proben aufbereitet wurde und dessen Gehalt bekannt ist.

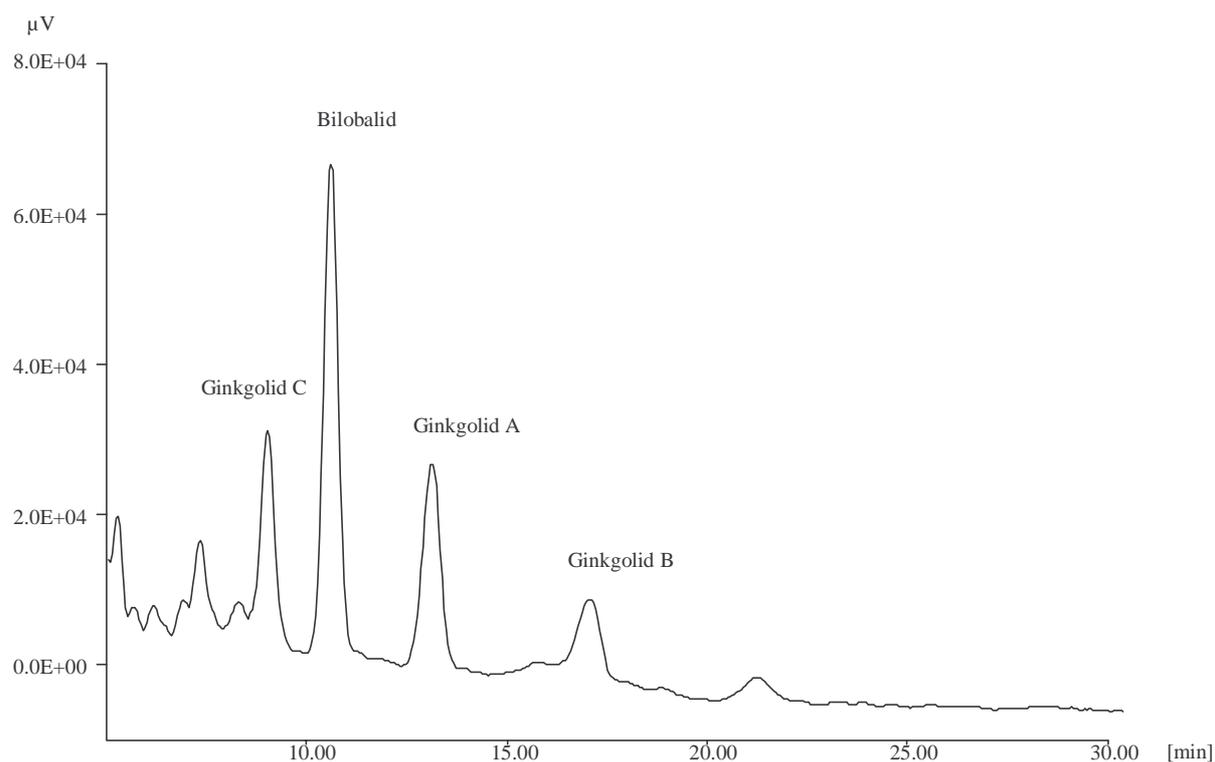
Die Chromatographie wurde durchgeführt mit

- einer Säule von 0,250 m Länge und 4,0 mm innerem Durchmesser, gepackt mit octylsilyliertem Kieselgel zur Chromatographie (5  $\mu\text{m}$ ),
- einer Mischung von 10 Volumenteilen Tetrahydrofuran, 20 Volumenteilen Methanol und 75 Volumenteilen Wasser als mobile Phase bei einer Durchflußrate von 1,0 ml je Minute,
- einem Differenzialrefraktometer als Detektor bei einer Temperatur von 35°C und
- einer 100- $\mu\text{l}$ -Probenschleife.

Das Gleichgewicht der Säule wurde mit der mobilen Phase bei einer Durchflußrate von 1,0 ml je Minute etwa 12 h lang eingestellt. 100  $\mu\text{l}$  Referenz- und Probenlösung wurden je zweimal eingespritzt.

Die chromatographischen Bedingungen wurden so gewählt, daß die Retentionszeit des Benzylalkohols zwischen 5 und 12 min lag (Anteil an Methanol in mobiler Phase ändern, falls erforderlich).

Abb. 8 zeigt ein typisches Chromatogramm eines EGb 761 enthaltenden Fertigpräparates mit den einzelnen Peaks Ginkgolid C, Bilobalid, Ginkgolid A und Ginkgolid B, deren Strukturformeln in Abb. 9 wiedergegeben sind.



**Abb. 8:** Typisches Chromatogramm der Terpenlaktone eines EGb 761 enthaltenden Präparates, Brechungsindexdetektor

Der Prozentgehalt an Terpenlaktonen errechnete sich als Summe der einzelnen Prozentgehalte an Bilobalid, Ginkgolid A, Ginkgolid B und Ginkgolid C. Die einzelnen Peakflächen der Terpenlaktone wurden jeweils in die Geradengleichung eingesetzt, die man durch die Eichung mit Benzylalkohol ermittelt hatte. Das Ergebnis wurde mit dem entsprechenden Umrechnungsfaktor multipliziert (wegen des Bezugs auf Benzylalkohol) und auf 100 mg Extrakt hochgerechnet, um den prozentualen Gehalt bezogen auf den Extrakt zu erhalten.

Die entsprechenden Flächenumrechnungsfaktoren sind nachfolgend angegeben:

Bilobalid 1,20

Ginkgolid A 1,22

Ginkgolid B 1,19

Ginkgolid C 1,27

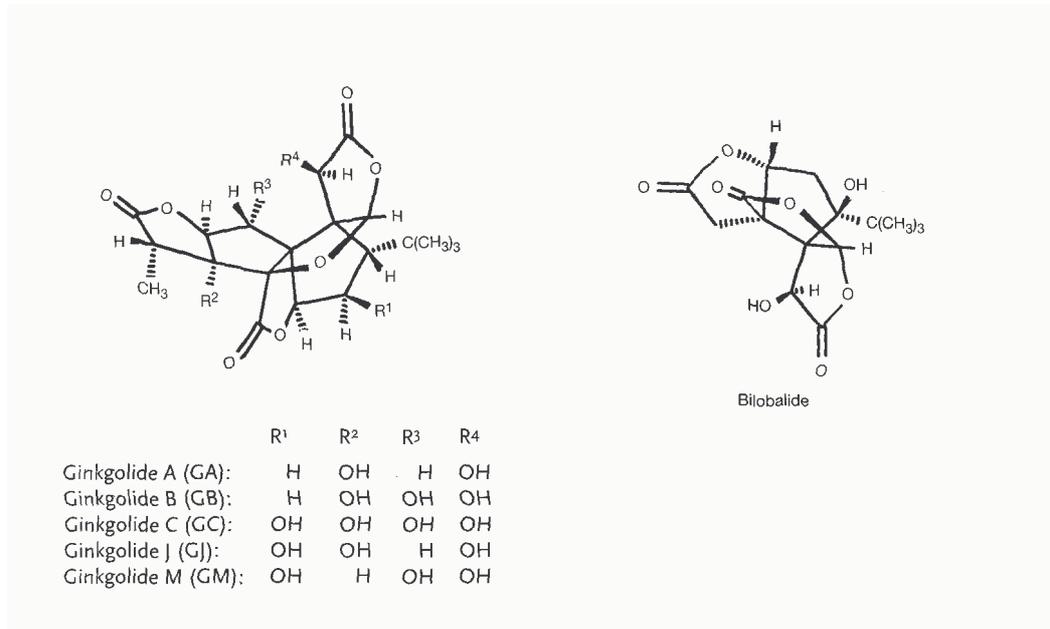


Abb. 9: Strukturformeln der Terpenlaktone

### 2.2.1.2 Wirkstofffreisetzung aus festen Arzneiformen *in vitro* nach amerikanischem Arzneibuch (The United States Pharmacopeia USP 23)



Im Rahmen des Vergleiches der pharmazeutischen Qualität verschiedener amerikanischer Ginkgo biloba-Fertigpräparate wurde eine Auswahl auf ihr Freisetungsverhalten *in vitro* getestet. Die verwendete Freisetungsapparatur wurde nach den Vorschriften der USP 23 mit Hilfe von Referenztabletten/-substanzen validiert.

---

Als Freisetzungsbedingungen wurden gewählt:

- Dissolutionsmedium: 900 ml 0,1 N HCl pH = 1, bzw. 900 ml Acetatpuffer pH = 4,5
- Temperatur:  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Umdrehungsgeschwindigkeit: 100 U/min
- Zeitpunkte der Probennahme: 15 min, 30 min und 60 min
- Probenvolumina: 30 ml

Zur Herstellung des Acetatpuffers pH = 4,5 wurden 2,99 g Natriumacetat-Trihydrat und 1,66 g Eisessig gelöst in 1000 ml Wasser. Tabletten wurden in einer Blattrührer-Apparatur (paddle) freigesetzt. Kapseln wurden sowohl in einer Drehkorbchen-Apparatur (basket) als auch - wegen der Vergleichbarkeit mit Freisetzungsdaten von Tabletten - in einer Blattrührer-Apparatur (paddle) mit Beschwerung durch 1-2 Windungen Lötzinn freigesetzt.

10 ml der gezogenen Probenvolumina wurden durch Glasfaser-Filter (Whatman® Glass Micorfibre Filters GF/D) filtriert und zur Bestimmung der prozentualen Freisetzung an Flavonglykosiden verwendet. Entnommene Probenvolumina wurden durch temperiertes Dissolutionsmedium ersetzt. Als Referenz (definitionsgemäß 100% Freisetzung) diene eine Lösung in 0,1 N HCl bzw. Acetatpuffer von zermörserter Tabletten- bzw. Kapselmasse von der jeweils freigesetzten Charge. Sowohl Proben als auch Referenzlösungen wurden im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 360 nm je zweifach vermessen.

Zur Bestimmung der Freisetzung von Terpenlaktone per HPLC wurden die restlichen 20 ml Probe aufgearbeitet wie im Methodenteil „Gehaltsbestimmung der Terpenlaktone“ beschrieben. Allerdings wurde der Rückstand nach dem Einrotieren in nur 1,0 ml mobiler Phase aufgenommen. Auch hier diene als Referenz (100 % Freisetzung) eine Lösung in 0,1 N HCl bzw. Acetatpuffer von zermörserter Tabletten- bzw. Kapselmasse der jeweils freigesetzten Charge.

---

## 2.2.2 *In vitro*-Versuche an verschiedenen Zellkultursystemen

Nachfolgend werden Methoden und Zelllinien beschrieben, die in *in vitro*-Experimenten eingesetzt wurden.

### 2.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit den hier verwendeten Zellen bzw. Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 94 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in sterilen Gewebekulturschalen und -flaschen inkubiert. Die geeigneten Kulturmedien für die jeweiligen Zelltypen sind in der Beschreibung der einzelnen Zellarten genannt. Zum Waschen der Zellen diente im allgemeinen PBS (Phosphate Buffered Saline).

### 2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension (aus einem definierten Volumen) mit 90 µl Trypan-Blau 0,4 % vermischt und ein Aliquot in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, indem das arithmetische Mittel aus mehreren Zählquadraten gebildet wurde und mit dem Kammerfaktor sowie der Verdünnung multipliziert wurde. Tote Zellen nehmen den Farbstoff aufgrund ihrer gestörten Membranfunktion irreversibel auf und können dadurch im Lichtmikroskop identifiziert werden.

### 2.2.2.3 Verwendete Zellen

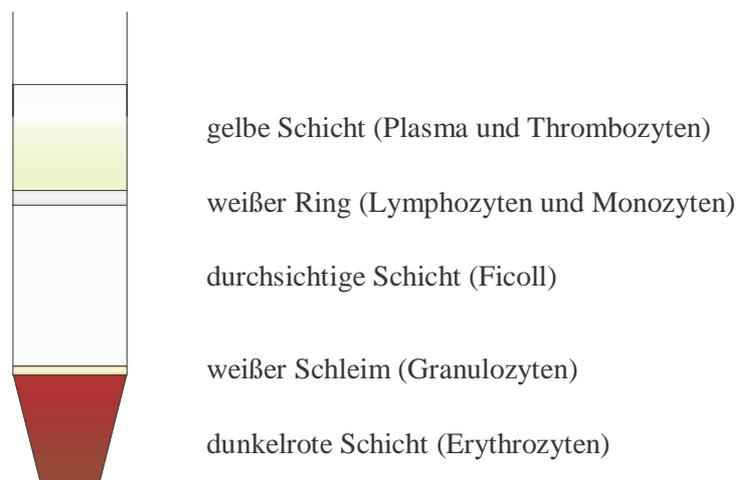
#### 2.2.2.3.1 *Periphere Blutlymphozyten (PBL)*

PBL oder auch PBML (Peripheral Blood Mononuclear Lymphocytes) bestehen überwiegend aus T-Zellen (60 – 70 %, Träger der zellvermittelten Immunität), B-Zellen (5 – 10 %, Träger der spezifischen humoralen Immunität und Vorläufer der Plasmazellen), NK-Zellen (natürliche Killerzellen mit erworbener oder spontaner zytotoxischer Aktivität, 5 – 10 %) und Monozyten.

Zur Gewinnung von PBML wurde menschliches Vollblut mittels Multifly<sup>®</sup> Kanülen aus der Armvene in 9 ml NH<sub>4</sub>-Heparin-Monovetten (15 IU Ammoniumheparin/ml Blut) entnommen - je nach Zellbedarf bis zu zwei Monovetten. Nach der Abnahme war auf eine gute Durchmischung des Blutes mit dem Heparin durch Rollen zwischen den Handinnenflächen oder vorsichtiges Schütteln zu achten.

---

Zur Isolierung der PBML wurde in Anlehnung an das von Böyum (Böyum, 1968) entwickelte klassische Trennverfahren eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Der Inhalt der Monovetten wurde unter sterilen Bedingungen (mikrobiologische Sicherheitswerkbank) in ein 50 ml Probenröhrchen gegeben. Das Vollblut wurde mit dem gleichen Volumen an 25° C warmen PBS vermischt. In einem weiteren 50 ml Probenröhrchen wurden 20 ml gebrauchsfertige Ficoll-Lösung (Ficoll ist ein hydrophiles Saccharose-Polymer mit einer Dichte von 1,077 g/ml) vorgelegt und mit 20 – 30 ml des Blut/PBS-Gemisches vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde bei 2000 rpm (913 g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Auslaufen der Zentrifuge erfolgte unter Ausschaltung der Bremsfunktion, um den Dichtegradienten nicht zu zerstören. Durch diese Dichtegradientenzentrifugation wurden die mononukleären Blutzellen (Lymphozyten und Monozyten) von den Erythrozyten, polymorphkernigen Leukozyten und Granulozyten getrennt. Die Leukozyten in der Interphase (s. Abb. 10) (Reinheit: > 95% Lymphozyten, < 5% Monozyten) wurden mit einer sterilen Pipette vorsichtig abgezogen und zweimal mit PBS gewaschen. Das kleine Zellpellet wurde in wenig Kulturnedium (RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Antibiotika-Mischung aus Penicillin (10.000 IU/ml) + Streptomycin (10.000 IU/ml)) aufgenommen und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Im Rahmen von MTT-Experimenten wurden die Zellen in Medium gehalten, welches nur 2 % Serum insgesamt enthielt, um durch hohe Eigenabsorptionen des Mediums bedingte Störungen der Messung zu vermeiden.



**Abb. 10:** Lymphozyten-Isolierung durch einen Ficoll-Gradienten im PP-Röhrchen

#### 2.2.2.3.2 Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen sind menschliche, tumoröse T-Zellen aus Leukämie-Patienten. Sie wachsen kontinuierlich in Suspension als monoklonale Kultur. Sie ähneln in ihrer Morphologie Lymphoblasten. Das übliche Nährmedium ist RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % Antibiotika-Mischung (Penicillin (10.000 IU/ml) + Streptomycin (10.000 IU/ml)). Als Einfriermedium eignet sich 90 % FCS + 10 % DMSO. Nach entsprechender Aktivierung (mit z. B. Phorbolestern oder Calcium-Ionophoren) ist mit einer IL-2-Produktion zu rechnen, und eine Ausdifferenzierung zu Lymphoblasten ist möglich.

#### 2.2.2.3.3 PC 12- Zellen (*Phaeochromocytoma Cells*)

PC 12-Zellen stammen ursprünglich aus einem transplantierbaren Phäochromozytom männlicher Ratten. Sie wachsen in kleinen Clustern und adhären nur sehr schwach. Das Anhaften kann durch Beschichtung der Kulturgefäße mit Collagen verbessert werden.

PC 12-Zellen synthetisieren und speichern Catecholamine, wie Dopamin und Noradrenalin. Des Weiteren exprimieren sie NGF (Nerve Growth Factor)-Rezeptoren, so daß durch die Zugabe von NGF die Zellen reversibel zur Umwandlung zu Zellen mit neuronalem Phänotyp induziert werden können. Sie beginnen, sich durch NGF-Zugabe zu vervielfältigen und bilden variköse, sich verzweigende Fortsätze aus, wie es sympathische Nervenzellen in einer Primärkultur tun. Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sie sich als Modellsystem für neurobiologische und neurochemische Studien (Greene & Tischler, 1976).

---

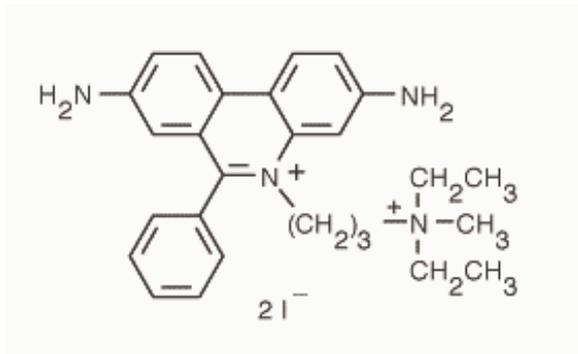
Zur Haltung in Kultur eignet sich DMEM-Medium, welches mit 10 % FCS, 5 % Pferdeserum und 1% einer Antibiotika-Mischung aus Penicillin (10.000 IU/ml) und Streptomycin (10.000 IU/ml) versetzt ist. Zum Einfrieren wird normales Kulturmedium mit 5 % DMSO vermischt. Für Experimente im Rahmen des MTT-Assays wurden die Zellen in Medium überführt, welches nur 2 % Gesamtserum enthielt, um hohe Eigenabsorptionen des Mediums und dadurch bedingte Störungen der photometrischen Messung zu vermeiden.

#### 2.2.2.4 Quantifizierung der Viability (Lebendzellzahl) und Proliferation von Zellen in Kultur

Es sind einige Methoden zur Bestimmung der Viability und Proliferation in Zellkulturen entwickelt worden. Die Mehrzahl der modernen Assays wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt (96-well Platte). Diese Minimierung erlaubt einen raschen und simultanen Probendurchsatz in großer Zahl. Außerdem reduziert das Arbeiten in 96-well Platten die Menge benötigten Mediums, die Anzahl benötigter Zellen und den Verbrauch an Plastikware. Kolorimetrische Assays ermöglichen die Messung der Proben direkt in der 96-well Platte am ELISA Platten-Reader.

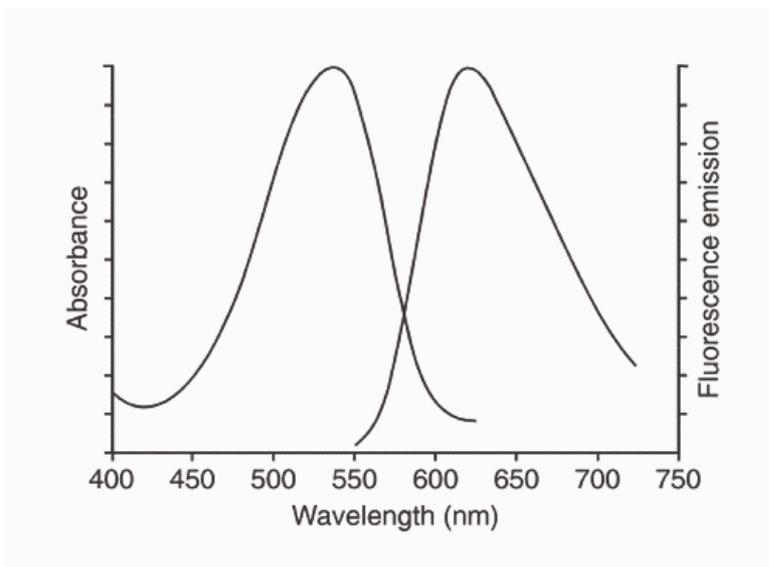
##### 2.2.2.4.1 Apoptosemessung durch Färbung mit Propidium-Iodid

Propidium-Iodid ist ein Fluorochrom, welches durch Interkalieren mit doppelsträngiger DNA/RNA den gesamten DNA/RNA-Inhalt der Zelle abzubilden vermag. Durch  $\pi$ -Elektronenverschiebung zwischen PI und DNA/RNA-Basen verändert sich das Emissionsmaximum des Farbstoffes. Der Farbstoff durchdringt allerdings keine intakten Zellmembranen, weshalb man die Zellen vor bzw. bei der Färbung lysieren muß. Der für die Färbung und Lyse der Zellen verwendete Propidium-Iodid-Lysepuffer (50  $\mu$ g PI/ml) wurde folgendermaßen angesetzt: 2,5 mg Propidium-Iodid wurden in ein 50 ml Probenröhrchen eingewogen, mit jeweils 5 ml Triton X-100 1%ig und Natriumcitrat-Lösung 1%ig versetzt und mit 40 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Zur Aufbewahrung umwickelt man das Probenröhrchen gegen Lichteinfall mit Alufolie und lagert es im Kühlschrank. Die Strukturformel des Propidium-Iodids ist in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11:** Strukturformel von Propidium-Iodid

Der Farbstoff liegt wie, die meisten DNA-Interkalatoren, in planarer Konformation vor. Er bindet mit geringer oder keiner Sequenz-Präferenz in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Farbstoffmolekül zu 4 – 5 Basenpaare an die DNA. Dementsprechend ist die emittierte Fluoreszenz-Intensität abhängig von der Länge der DNA-Moleküle; je mehr Basenpaare das DNA-Molekül besitzt, desto stärker ist die Fluoreszenz-Intensität nach entsprechender Anregung. Die Anregungs- bzw. Absorptionswellenlänge für Propidium-Iodid liegt bei 488 nm, die Emissionswellenlänge bei 617 nm, wie man aus Abb. 12 erkennen kann.



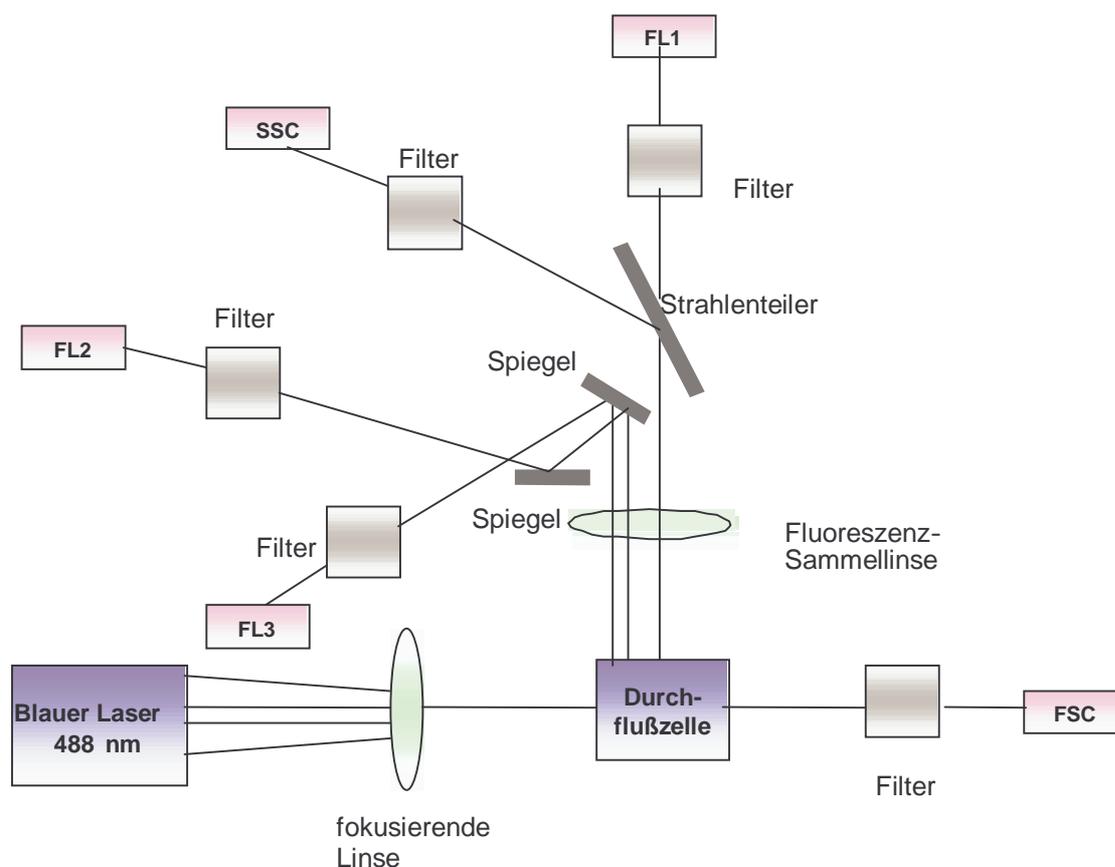
**Abb. 12:** Absorptions- und Emissionsspektrum von Propidium-Iodid

Die Messung der apoptotischen Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie an einem FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter). Die Methode der Durchflußzytometrie bietet einige Vorteile in der Analyse der Apoptose im Vergleich zum Mikroskop: Ein Vorteil dieser Methode ist der hohe Probendurchsatz durch die schnelle Messung der Zellen im Durchfluß. Tausende von individuellen Zellen können innerhalb von Sekunden sehr genau

und reproduzierbar gemessen werden. Außerdem ist die Methode objektiv im Gegensatz zur Apoptose-Messung unter dem Mikroskop, die von der visuellen Wahrnehmung abhängt. Des Weiteren können Zellsubpopulationen identifiziert und von anderen Populationen durch elektronisches Abgrenzen (gating analysis) getrennt betrachtet und detektiert werden. Der größte Vorteil der Durchflußzytometrie ist jedoch die Möglichkeit, mehrere Parameter gleichzeitig analysieren zu können, z. B. Oberflächenmarker, DNA-Inhalt von Zellen etc. (Darzynkiewicz *et al.*, 1994).

Die Apoptose geht mit charakteristischen morphologischen, biochemischen und molekularen Veränderungen einher, die als spezifische Marker in der Durchflußzytometrie analysiert werden können. Ein frühes Ereignis der Apoptose ist die Dehydratation, die zum Schrumpfen der Zelle führt (cell shrinkage). Diese Veränderung der Zelle zeigt sich in einer verminderten Lichtstreuung des Laserstrahles in Vorwärtsrichtung (FSC, Forward Scatter), welche mit der Zellgröße korreliert. Zellen im späten Stadium der Apoptose oder apoptotic bodies sind charakterisiert durch geringe Intensität des FSC-Signals. Chromatin-Kondensation, die oft gefolgt ist von Kernfragmentation, ist ein weiteres charakteristisches Merkmal der Apoptose. Dieses zeigt sich in veränderten Reflexionen und Brechungen des Lichtstrahls im Sideward Scatter (SSC, 90° Winkel zum Laserstrahl). So kann man durch die Analyse des FSC- und SSC-Signals Veränderungen von apoptotischen Zellen allein aufgrund der physikalischen Eigenschaften - ohne Messung der Fluoreszenz - erkennen. Allerdings sind die Veränderungen der Lichtstreuung/-brechung für die Apoptose nicht spezifisch genug, so daß Färbemethoden mit der Durchflußzytometrie gekoppelt werden sollten.

Im Durchflußzytometer werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom so geführt, daß nur jeweils eine Zelle die Öffnung passieren kann. Ein Laserstrahl trifft auf die vorbeifließenden Zellen, wobei er Fluoreszenzerscheinungen anregt. Die Signale werden über Spiegel und Filtersysteme Detektoren zugeführt, die die Lichtimpulse in elektrische Signale umwandeln. Diese werden von einer elektronischen Pulsanalyse in Größenklassen eingeteilt, gespeichert und als Häufigkeitsdiagramm der Fluoreszenz-Intensität dargestellt. Abb. 13 zeigt schematisch den Aufbau des optischen Systems des FACS Calibur-Gerätes.

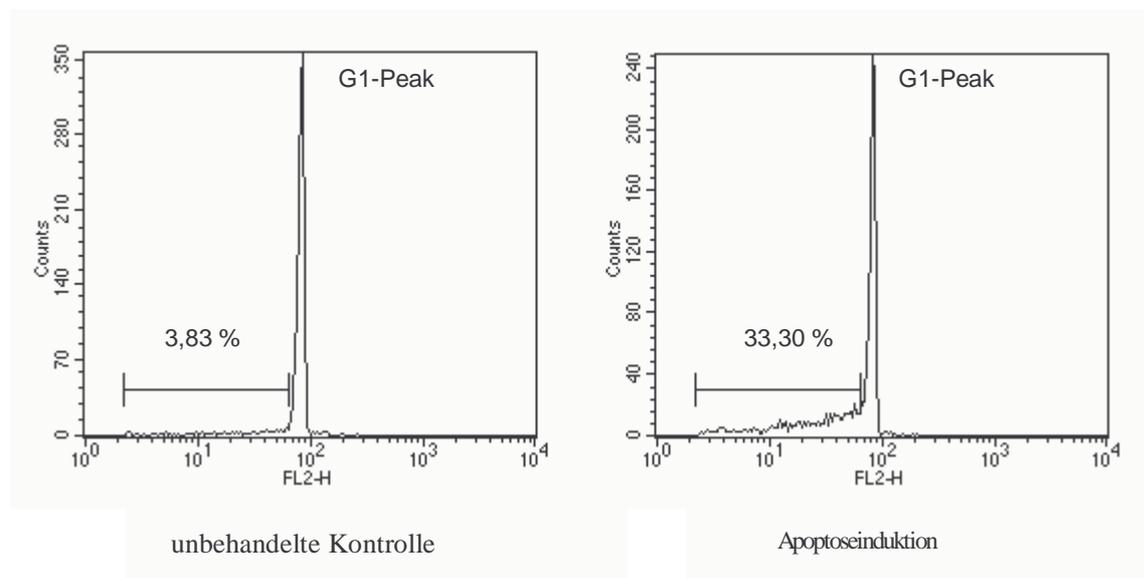


**Abb. 13:** Schematischer Aufbau des FACS-Gerätes

Mit FL1, 2 oder 3 werden die einzelnen Fluoreszenz-Detektoren bezeichnet, die aufgrund der davor geschalteten Filter verschiedene Wellenlängen detektieren und verstärken. FL1 sammelt Lichtsignale mit der Wellenlänge  $530 \pm 30$  nm, FL2 mit  $585 \pm 42$  nm und FL3 mit 650 nm oder länger. SSC bedeutet Sideward Scatter und FSC Forward Scatter.

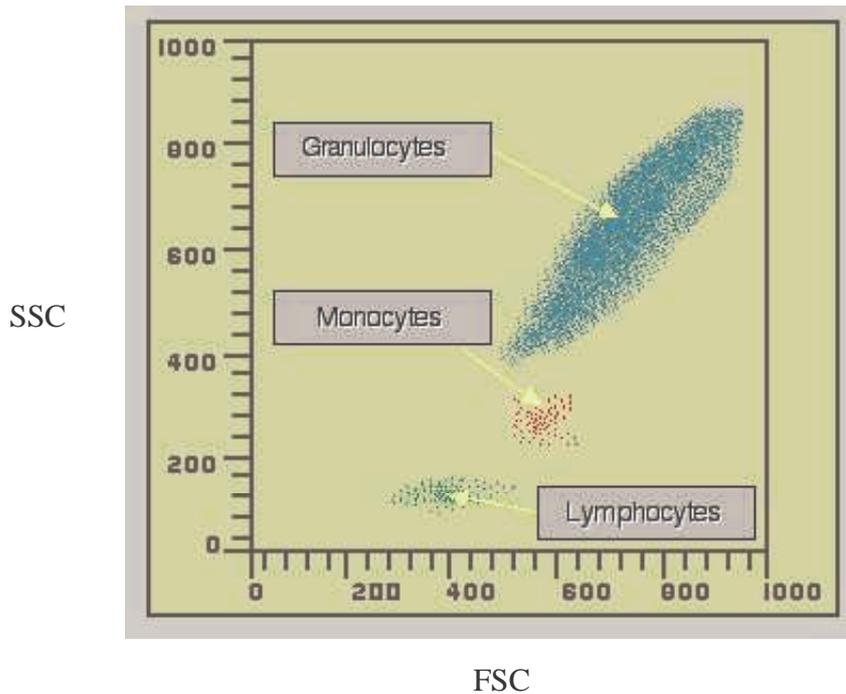
Für einen Versuchsansatz wurden die Lymphozyten bzw. Jurkat-Zellen auf etwa 1 Million Zellen pro Milliliter Medium (RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PenStrep) eingestellt und davon 100  $\mu$ l Zellsuspension ( $\Rightarrow$  100.000 Zellen pro well) in eine 96-well Platte mit flachem Boden ausgesäht. Dazu wurden 100  $\mu$ l Protektor (z. B. Ginkgo-Extrakt) und gegebenenfalls auch Apoptose-Induktor (z. B. Staurosporin) pipettiert. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank wurde die 96-well Platte auf Eis gebracht. Die Proben wurden in eine 96-well Rundboden-Platte überführt, um bei der anschließenden Zentrifugation ein klar begrenztes Pellet zu erhalten. Für 5 min wurde bei 4° C und 310 x g (13000 rpm, r = 163 mm) zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend einmal mit eiskaltem PBS 200  $\mu$ l/well gewaschen. Das Zellpellet wurde danach in 250  $\mu$ l Propidium-Iodid-Lysepuffer aufgenommen, die Proben in FACS-Röhrchen überführt und - nach etwa 30 min auf Eis und lichtgeschützt - am FACSCalibur mithilfe der CellQuest™-Software analysiert. 5.000 Zellen jeder Probe wurden im FL-2 vermessen.

Wird die Fluoreszenzintensität des Propidium-Iodids gegen die Zellzahl (counts) aufgetragen, können die apoptotischen Zellen als Sub-G1-Peak/Bereich im DNA-Histogramm quantifiziert werden (s. Abb. 14).



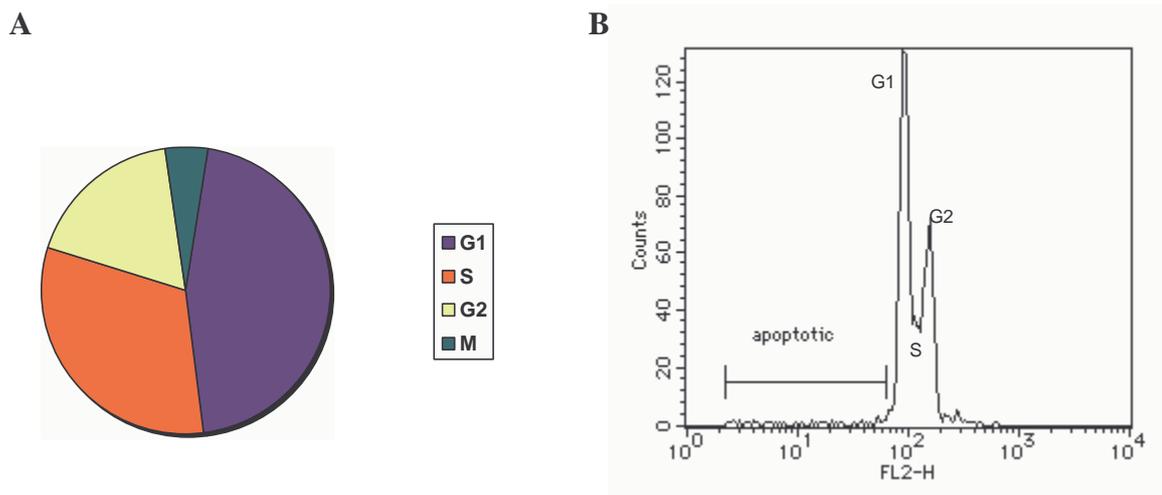
**Abb. 14** : Histogramme PI-gefärbter Lymphozyten (apoptotische Zellen in % von der Gesamtzellzahl)

Zur Vermeidung der Detektion von doppelsträngiger RNA, die ebenfalls von PI angefärbt wird und im sehr frühen Sub-G<sub>0</sub>-DNA-Peak erscheint, müssen die Ereignisse mit sehr geringer Fluoreszenz-Intensität durch elektronisches Gaten (Bereich markieren) ausgeschlossen werden. Genauso läßt sich durch Gaten in einer Auftragung FSC gegen SSC zwischen Subpopulationen aufgrund ihrer Größe und Granularität differenzieren (s. Abb. 15).



**Abb. 15:** Differenzierung von Subpopulationen im FSC gegen SSC

Der Zellzyklus, d.h. der Zeit von Zellteilung zu Zellteilung, kann grob in zwei Phasen unterteilt werden: die Mitose und die Interphase, die wiederum aus G1-, S- und G2-Phase besteht. Nach jeder Mitose folgt eine Interphase. Diese beginnt zunächst mit einer Periode, in der keine DNA synthetisiert wird. Dies ist die G1-Phase (Gap = Lücke). Sie ist durch starke RNA-Synthese, also auch Proteinbiosynthese, gekennzeichnet. In der darauffolgenden S-Phase (S = Synthese) findet die Replikation der DNA statt. Daran schließt sich eine weitere Phase, die G2-Phase an. Jedes Chromosom besteht nun bereits aus zwei Chromatiden. Die Zelle kann nun in die Phase der Mitose, die durch Transport- und Verteilungsvorgänge charakterisiert werden kann, eintreten. Diese Vorgänge sind der letzte, mikroskopisch sichtbare Teil der Zellteilung. Der entscheidende Vorgang, die DNA-Replikation, findet also während der S-Phase statt und kann nur durch Messung des DNA-Gehaltes des Zellkerns erkannt werden (Reinhard, 1990). Die Abbildung 16A zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Phasen im Zellzyklus und 16B ein Beispiel-Histogramm (PI-angefärbt), an dem sich die einzelnen Zellzyklus-Phasen entsprechend ihrer DNA-Gehalte abzeichnen.

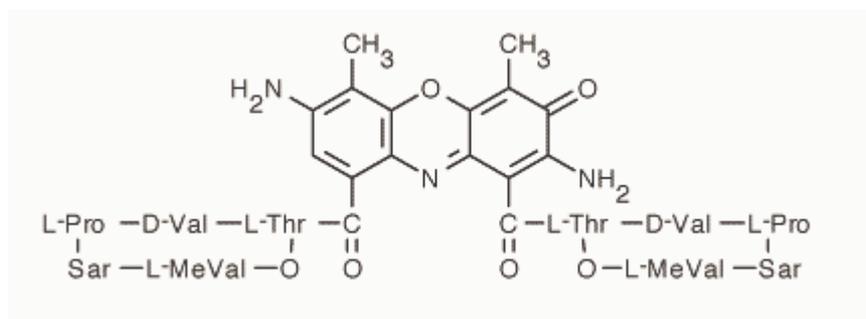


**Abb. 16A:** Kreisdiagramm der einzelnen Zellzyklus-Phasen

**B:** Histogramm einer PI-Färbung unter Kennzeichnung der verschiedenen Zellzyklus-Phasen

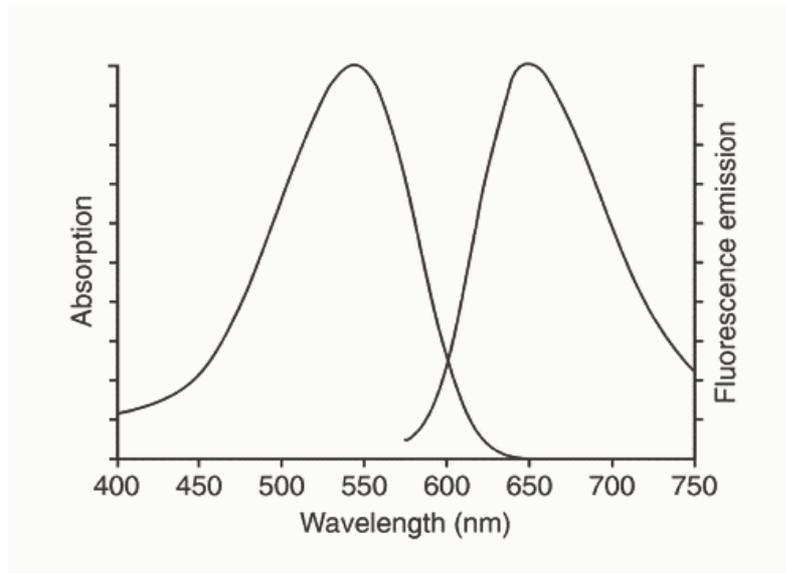
#### 2.2.2.4.2 Zelltodmessung mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)

7-AAD (Strukturformel s. Abb. 17) ist ein rot fluoreszierendes Analogon zu Actinomycin D, welches mit den G – C (Guanin-Cytosin)-Regionen der DNA interkaliert.



**Abb. 17 :** Strukturformel des 7-Aminoactinomycin (7-AAD)

Die Absorptionswellenlänge liegt bei ungefähr 550 nm, die der Emission bei etwa 650 nm (s. Abb. 18).

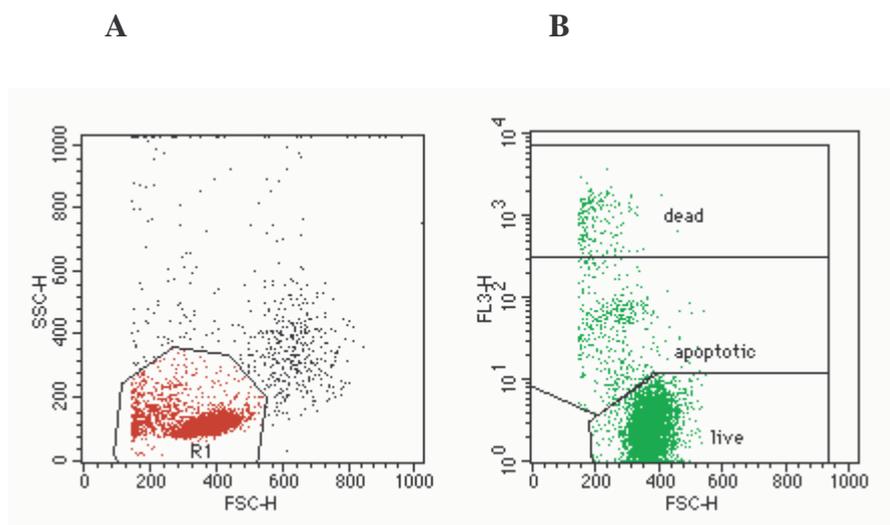


**Abb. 18 :** Absorptions- und Emissionswellenlänge des Interkalators 7-AAD

Der Farbstoff wurde in einer Konzentration von 1,57 mM in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst und in einer Endkonzentration von 7,8  $\mu\text{M}$  in der Zellsuspension eingesetzt. Nach 15 minütiger Inkubation im Dunkeln bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur wurden die Zellen mit CellWash™ gewaschen und anschließend in 250  $\mu\text{l}$  CellWash™ aufgenommen. Danach wurden sie sofort per Durchflußzytometrie am FACSCalibur mithilfe der CellQuest™ -Software analysiert. Je 5000 Zellen pro Probe wurden in FL 3 vermessen.

Auch bei diese Färbung kann man im FACS bei der Auftragung SSC gegen FSC die Zellen elektronisch gaten (markieren), die man analysieren möchte (s. Abb. 19A, rot markierter, begrenzter Bereich). So kann man beispielsweise autofluoreszierende Zellen von der Analyse ausschließen.

Wenn man die Fluoreszenzintensität gegen den FSC (Forward Scatter) aufträgt, erhält man eine Abbildung wie in Abb. 19B, in der man deutlich lebende, apoptotische und nekrotische (dead) Zellen voneinander trennen kann.



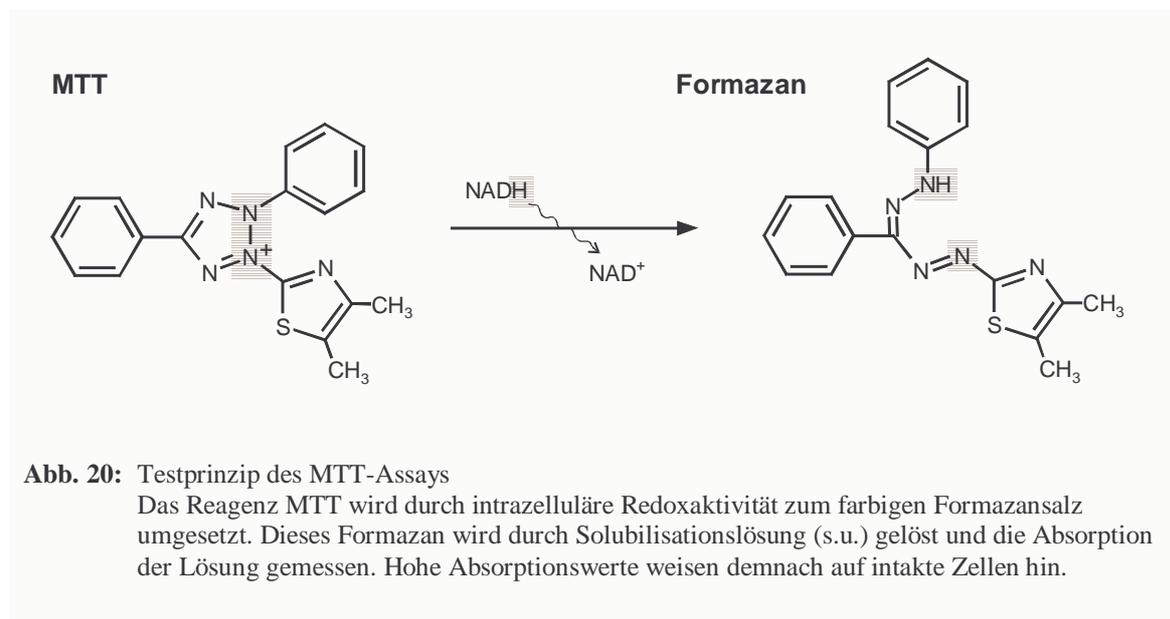
**Abb. 19:** Exemplarische Histogramme zur 7-AAD-Färbung

#### 2.2.2.4.3 Quantifizierung der Viability und Proliferation mit Hilfe des MTT-Assays

Zellschädigungen haben unvermeidlich einen Verlust der Fähigkeit, den Energiehaushalt der Zelle aufrechtzuerhalten und neue Energie zu liefern, zur Folge, was für die Funktion und das Wachstum metabolisch aktiver Zellen essentiell ist. Assays, die auf der metabolischen Aktivität von lebenden Zellen beruhen, messen häufig die mitochondriale Aktivität.

Ein weitverbreiteter Assay zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation und Zytotoxizität ist der MTT-Assay. Die Zellen werden mit dem kolorimetrischen Substrat Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) inkubiert. Da das Tetrazoliumsalz nur von metabolisch aktiven Zellen zu dem farbigen Formazan reduziert wird, detektiert dieser Assay ausschließlich lebende Zellen.

MTT wird durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System, welches zur mitochondrialen Atmungskette gehört, zum Formazan gespalten. Deshalb galt der Assay lange Zeit als mitochondrialer Assay (s. Abb. 20).



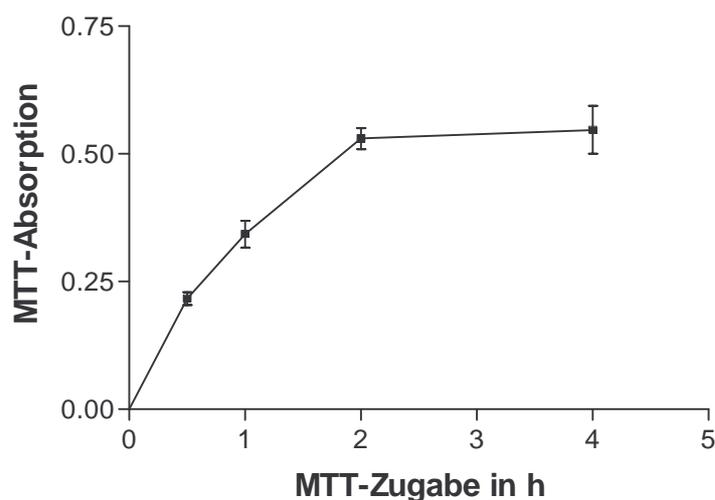
Interessanterweise zeigen neuere Befunde, daß der mitochondriale Elektronentransport (Atmungskette) eine geringe Rolle in der zellulären Reduktion des MTT spielt. Ein Großteil der zellulären Reduktion tritt im Zytoplasma auf. Eine Reihe von NADH- bzw. NADPH-abhängigen Redoxenzymen scheinen an der MTT-Reduktion beteiligt zu sein (Berridge & Tan, 1993b).

- MTT-Assay an PC 12 Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden in 96-well Platten mit einer Zellzahl von 50.000 pro well angesetzt. Diese Zellzahl erbrachte eine ausreichende Enzymaktivität zur Umsetzung des MTT-Reagenzes und nachfolgend eine Absorptionsintensität im linearen Bereich. Die Zellen wurden in der Regel für 24 Stunden mit dem Zelltod-Induktor und/oder Protektor koinkubiert. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 100 µl. Zwei Stunden vor Ende der Inkubation wurden 20 µl des gebrauchsfertigen MTT-Reagenzes zu dem Ansatz zugegeben und für zwei Stunden im Brutschrank zur Umsetzung zum farbigen Formazansalz auf den Zellen belassen. Nach Ablauf der zwei Stunden wurden die gebildeten Formazan-Kristalle mithilfe 100 µl Solubilisations-Lösung, die im Vergleich zur Vorschrift des MTT-Assays nach Boehringer Mannheim leicht modifiziert wurde, über Nacht aufgelöst und bei 570 nm spektrophotometrisch per ELISA-Reader vermessen.

Die Modifikation der Solubilisationslösung war notwendig, weil die Auflösung der gebildeten Formazankristalle im vorgesehen Zeitrahmen nicht vollständig (Kontrolle durch das Mikroskop) vonstatten ging. Deshalb erfolgte die Änderung der Zusammensetzung: 27 g Natriumdodecylsulfat wurden zusammen mit 90 ml N,N-Dimethylformamid in 90 ml Solubilisationslösung von Boehringer Mannheim bei 37 °C gelöst und anschließend auf pH 4,7 eingestellt.

In Vorversuchen wurde die Abhängigkeit der MTT-Absorption von der Zugabezeit (0,5 – 4 h) des MTT auf unbehandelten Zellen untersucht. Nach zwei Stunden wurde das Maximum der MTT-Absorption erreicht und bildete mit dem Vier-Stunden-Wert ein Plateau (s. Abb. 21). Demzufolge wurden alle folgenden Experimente mit einer Umsetzungszeit des MTT-Reagenzes von 2 h durchgeführt.



**Abb. 21:** Abhängigkeit der MTT-Absorption von der MTT-Zugabezeit in h an PC 12-Zellen, Mittelwerte  $\pm$  SD, n = 2 (jeweils Dreifachbestimmung)

---

- MTT-Assay an PBMC

In Vorversuchen wurde eine Zellzahl-Abhängigkeit der MTT-Umsetzung durchgeführt. Die Rate der Umsetzung des MTT-Reagenzes zum farbigen Formazan bestimmt – wie oben erwähnt – die Intensität der Färbung. Diese wiederum hängt von der Aktivität und von der Zahl der Zellen ab. Da Lymphozyten extrem klein und anscheinend auch weniger enzymatische Aktivität als beispielsweise PC12-Zellen besitzen, mußten für eine ausreichende Absorption 500.000 Zellen pro well eingesetzt werden. In den nachfolgenden Versuchen wurde ein 100 µl Ansatz (Zellen + Induktor/Protektor) für 21 bis 22 Stunden inkubiert, anschließend 20 µl MTT-Reagenz zugesetzt, für weitere zwei bis drei Stunden inkubiert und anschließend die Formazansalze solubilisiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

## 2.2.3 Bioverfügbarkeitsstudie zweier amerikanischer Ginkgo biloba-Präparate

### 2.2.3.1 Studienziel

Das Ziel der Studie war die vergleichende Charakterisierung der Bioverfügbarkeit von zwei Darreichungsformen, die Ginkgo-Extrakt enthalten. Das **Referenzprodukt** Ginkgold® (Hersteller: Dr. W. Schwabe GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland, Vertreiber: Nature's Way Inc., Springville, USA, 60 mg Ginkgo biloba Trockenextrakt je Tablette) ist in den USA auf dem Markt und wird auch unter anderem Namen in Deutschland vertrieben. Das **Testprodukt** Ginkgo biloba Kapseln (Centrum Herbals/Whitehall-Robins Healthcare, Madison, USA, 60 mg Ginkgo biloba Trockenextrakt je Kapsel) ist als Nahrungsergänzungsmittel in den USA auf dem Markt. Je zwei Darreichungsformen des Test- bzw. Referenzproduktes wurden in einer offenen, randomisierten, monozentrischen Studie an zwölf gesunde, junge Männer verabreicht. Bestimmt wurde die relative Bioverfügbarkeit der Präparate anhand der pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe Ginkgolid A, B und Bilobalid. Die singel dose Applikation erfolgte unter Nüchternbedingungen und in einem Zwei-Perioden-crossover-Design. Die Auswaschphase betrug eine Woche.

### 2.2.3.2 Probandenkollektiv

Für die Studie wurden zwölf gesunde Männer im Alter zwischen 21 und 53 Jahren (Mittelwert  $\pm$  SD: 33,3  $\pm$  10,1) rekrutiert. Deren Körpergröße reichte von 168 – 196 cm (Mittelwert  $\pm$  SD: 183,1  $\pm$  8,3 cm), ihr Gewicht von 69 – 95 kg (Mittelwert  $\pm$  SD: 78,6  $\pm$  8,7 kg) und ihr Body-Mass-Index von 19 – 27 kg/m<sup>2</sup> (Mittelwert  $\pm$  SD: 23,5  $\pm$  2,3 kg/m<sup>2</sup>). Die Studienteilnehmer wurden vorab einer umfassenden allgemeinärztlichen Voruntersuchung unterzogen. Frauen wurden nicht einbezogen (die toxikologischen Daten geben zwar keine Hinweise auf eine potentielle Fruchtschädigung, da jedoch zum aktuellen Zeitpunkt Daten an Frauen nicht verfügbar sind, wurden lediglich Männer herangezogen). Die Untersuchung beinhaltete Anamnese einschließlich Blutdruck, Puls, Körpertemperatur und EKG sowie die Erhebung relevanter klinisch-chemischer Parameter. Nach Vorliegen sämtlicher Untersuchungsergebnisse entschied der verantwortliche Arzt (d.h. der Leiter der klinischen Prüfung sowie gegebenenfalls die beteiligten Prüfärzte) unter Berücksichtigung der im Prüfplan aufgeführten Einschluß- und Ausschlußkriterien über den Einschluß der Probanden.

---

### 2.2.3.3 Einschluß- und Ausschlußkriterien

Als **Einschlußkriterien** galten:

- Zentraleuropäer mit Ausnahme der Mittelmeeranrainer
- Alter: 18 bis 55 Jahre
- Body-Mass-Index (BMI) zwischen 19 kg/m<sup>2</sup> und unter 27 kg/m<sup>2</sup>
- guter Gesundheitszustand (ohne klinisch relevante Abweichungen der klinischen Untersuchungsergebnisse sowie der Laborparameter)
- Geschlecht: männlich
- die Gabe des schriftlichen Einverständnisses in die Teilnahme an der Studie nach Erhalt angemessener Informationen über Vorteile, Risiken und Versicherung

Als **Ausschlußkriterien** galten:

- pathologische Laborbefunde
- pathologisches EKG (12 Ableitungen)
- bestehende kardiologische, hämatologische, hepatische, renale oder gastrointestinale Erkrankungen und/oder pathologische Befunde, die mit der Sicherheit, der Verträglichkeit, der Resorption und/oder der Pharmakokinetik der Substanz interferieren könnten
- andere akute oder chronische Erkrankungen, die die Resorption oder den Metabolismus beeinflussen könnten
- Drogen- oder Alkoholabhängigkeit
- positiver Hepatitis- (HBs-Ag, anti-HCV-Ak)- oder anti-HIV-Test
- eine Diät, die die Pharmakokinetik der Substanzen beeinflussen könnte
- starke Tee- oder Kaffeetrinker (mehr als 1 Liter pro Tag)
- starke Raucher (mehr als 10 Zigaretten pro Tag)
- Probanden, von denen angenommen werden muß, daß sie den Instruktionen im Laufe der Studie nicht Folge leisten werden
- Probanden, die nicht in der Lage sind, die schriftlichen und mündlichen Instruktionen zu verstehen insbesondere bezüglich der mit der Studienteilnahme verbundenen Risiken und Unannehmlichkeiten
- Blutspende oder anderweitiger Blutverlust von mehr als 400 ml innerhalb von 2 Monaten vor der Studie
- Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb von 2 Monaten vor der ersten Verabreichung der Studienmedikation

- 
- jegliche Einnahme von Medikamenten während der letzten 4 Wochen vor der Erstapplikation, es sei denn, aufgrund der Eliminationshalbwertszeit kann angenommen werden, daß der Arzneistoff oder dessen primäre Metabolite zum Zeitpunkt der Erstapplikation vollständig aus dem Körper ausgeschieden sein werden
  - wiederholte Einnahme von Medikamenten während der letzten 4 Wochen vor der Erstapplikation, die die hepatische Biotransformation verändern können (z.B. Barbiturate, Cimetidin, Phenytoin, Rifampicin)
  - wiederholte Einnahme von Medikamenten während der letzten 2 Wochen vor der Erstapplikation, die sich auf die Resorption auswirken können (Abführmittel, Metoclopramid, Loperamid, Antazida, H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten)
  - bekannte anaphylaktische Reaktion oder Überempfindlichkeit bezogen auf den Arzneistoff oder auf andere Bestandteile der Produkte
  - bekannte schwere Allergien oder multiple Arzneimitteallergien

#### 2.2.3.4 Studienablauf

Die Probanden wurden am Abend vor der Applikation in die Probandenstation der Klinik Bad Berka (20 km südlich von Weimar) einbestellt. Dort wurden sie nach ihrer Befindlichkeit befragt. Im Verdachtsfall wurde ein Alkohol- oder Drogentest durchgeführt. In der Station erhielten die Probanden ein standardisiertes Abendessen, das spätestens zwölf Stunden vor der geplanten Applikation beendet sein mußte. Danach fasteten die Probanden, das Trinken von Wasser war bis vier Stunden vor der Applikation gestattet.

Morgens wurden die Verweilkanülen gelegt, und es wurde eine Blutprobe vor der Applikation entnommen. Dann erfolgte die Applikation des jeweiligen Prüfpräparates und die nachfolgenden Blutabnahmen wurden entsprechend dem unten aufgeführten Abnahmeschema durchgeführt.

Die Probanden erhielten im Laufe der Studientage standardisierte Klinikmahlzeiten zu genau festgelegten Zeitpunkten (4, 8 und 11 Stunden nach der Applikation). Nach der letzten Blutabnahme (15 Stunden nach der Applikation) verließen die Probanden die Station. Im Abstand von eine Woche durchliefen dieselben Probanden mit analogem Ablaufplan den zweiten Teil der Studie.

Die **Blutabnahmen** erfolgten nach folgendem Abnahmeschema:

unmittelbar vor der Applikation (0 min) des Präparates und 30 min, 1 h , 1 h 30 min, 2 h,

---

2 h 30 min, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h und 15 h nach der Applikation (13 Blutabnahmen je Periode mit jeweils 9 ml Vollblut). Das Gesamtvolumen des im Laufe der Studie abgenommenen Blutes inklusive der Blutabnahmen für die Erhebung der klinisch-chemischen Parameter belief sich auf circa 250 ml pro Proband.

Zur Überprüfung der Sicherheit und Verträglichkeit wurden **unerwünschte Ereignisse** erfaßt. Innerhalb von 21 Tagen nach der letzten Blutabnahme durchliefen die Probanden die umfassende **medizinische Nachuntersuchung**.

Der Prüfplan umfaßte Angaben, wann ein Proband aus der Studie ausgeschlossen werden sollte (**Studienausschluß**). Dies war insbesondere der Fall bei Auftreten von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen oder ähnlichen Beeinträchtigungen der Gesundheit, bei fehlender Compliance oder, wenn der Proband die Studie abbrechen möchte. Arzneimittelspezifische Kriterien für den Studienabbruch waren nicht festgelegt, da für Ginkgo biloba keine gravierenden Nebenwirkungen bekannt sind. Im Falle des Ausscheidens eines Probanden aus der Studie war geplant, ihn durch einen anderen Probanden zu ersetzen, vorausgesetzt, daß nicht medizinische Gründe gegen eine Fortführung der Studie sprachen.

Während der Hospitalisierung galten bestimmte **Verhaltens Einschränkungen**, um eine Beeinflussung der zu untersuchenden pharmakokinetischen Parameter durch bestimmte Nahrungs- oder Genußmittel oder abnormale physiologische Bedingungen zu vermeiden. Den Probanden wurde das Rauchen verboten, normale körperliche Aktivitäten waren gestattet, starke körperliche Anstrengungen waren während der gesamten Studie verboten. Alkohol und Coffein-haltige Getränke oder Nahrungsmittel waren von 36 Stunden vor der Applikation bis zur letzten Blutabnahme in jeder Periode verboten. Grapefruit/Pampelmuse-enthaltende Getränke oder Speisen waren ab 7 Tagen vor der ersten Applikation bis zur letzten Blutabnahme der letzten Periode verboten.

Die **Blutprobenaufarbeitung** erfolgte direkt im Anschluß an die Abnahme: die Blutproben wurden schnellstmöglich in ein Eis/Wasserbad gebracht. Wegen Instabilität der Terpenlaktone war es notwendig, jede Probe innerhalb von 20 min nach Gewinnung des Blutes 10 min bei 4 ° C mit 2700 g zu zentrifugieren, das Plasma abzutrennen und dieses mit 1 N HCl anzusäuern. Anschließend wurden die Proben bei – 20 ° C eingefroren.

### 2.2.3.5 Analyse der Plasmaproben

Anschließend an die klinische Studie erfolgte die **Analyse der Plasmaproben**. Ginkgolid A, Ginkgolid B und Bilobalid wurden mit einem internationalen Standards entsprechenden, validierten, selektiven und ausreichend empfindlichen analytischen Verfahren (GC-MS) im Plasma quantifiziert. Dieses analytische Verfahren war bereits etabliert mit einer unteren Bestimmungsgrenze von 1 ng/ml für jede der drei Substanzen.

Vor der Analyse der Plasmaproben der Probanden wurde eine **Vorstudienvalidierung** durchgeführt. Sie umfaßte die Untersuchung der Spezifität, Überprüfung der Linearität der Eichgerade und Festlegung der Bestimmungsgrenze, Bestimmung der Präzision und Richtigkeit von Intraday- und Interday-Analysen, der Wiederfindung, der Stabilität während der Probenaufbereitung und Standzeit im Autosampler und die Untersuchung der Stabilität nach drei Einfrier-Auftau-Zyklen.

Die Konstanz und Qualität der Messung innerhalb einer Analysenreihe wurde durch 6 **Qualitätskontrollproben** in 3 verschiedenen Konzentrationen, eine nahe der Bestimmungsgrenze, eine im mittleren Bereich und eine nahe am oberen Ende der Kalibrierung, sichergestellt. Der Kalibrierbereich wurde für Ginkgolide A und B von 1 ng/ml – 30 ng/ml gewählt und für Bilobalid von 1 ng/ml – 60 ng/ml. Pro Analysentag wurde eine Fünf-Punkte-Kalibrierung (Duplikate), drei verschiedene Konzentrationen QC-Proben (jew. Duplikate) und zwei Proben Leerplasma als Blindwert frisch hergestellt und analysiert. Dazu wurden die Plasmaproben zweier Probanden von Perioden I und II aufbereitet.

Für die Kalibrierung wurden folgende **Stammlösungen** hergestellt:

Stammlösung 1 (A, B): 1 mg Ginkgolid A, B + 200 µl HCl conc. / 20 ml Methanol

Stammlösung 2 (A, B): 1 ml Stlsg. 1 + 100 µl HCl conc. / 10 ml Methanol

Stammlösung 1 Bilobalid: 1 mg Bilobalid + 200 µl HCl conc. / 20 ml Methanol

Stammlösung 2 Bilobalid: 1 ml Stlsg. 1 + 100 µl HCL conc. / 10 ml Methanol

Stammlösung 1 ISTD: 1 mg interner Standard + 200 µl HCl conc. / 20 ml Methanol

Stammlösung 2 ISTD: 0,3 ml Stlsg. 1 ISTD / 50 ml Methanol

Aus diesen Stammlösungen wurden folgende **Kalibrierlösungen (K)** hergestellt:

K 1: 100 µl Stlsg. 2 (A, B) + 100 µl Stlsg. 2 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol

- 
- K 2: 200 µl Stlsg. 2 (A, B) + 50 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol
- K 3: 50 µl Stlsg. 1 (A, B) + 100 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol
- K 4: 100 µl Stlsg. 1 (A, B) + 300 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol
- K 5: 300 µl Stlsg. 1 (A, B) + 600 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol

Zur Herstellung der **Qualitätskontrollproben (QC)** durch Zudotieren bestimmter Mengen Ginkgolid A, B und Bilobalid in Leerplasma wurden die gleichen Stammlösungen wie zur Kalibrierung benutzt, allerdings separat eingewogen und hergestellt.

- QC 1: 200 µl Stlsg. 2 (A, B) + 50 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol
- QC 2: 50 µl Stlsg. 1 (A, B) + 100 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol
- QC 3: 100 µl Stlsg. 1 (A, B) + 300 µl Stlsg. 1 (Bilobalid) + 300 µl Stlsg. 1 ISTD + 100 µl HCl conc. / 50 ml Methanol

### **Probenvorbereitung**

Für die fünf Kalibrierungen wurden jeweils 900 µl Humanplasma mit 100 µl 1 N HCl und 20 µl Phosphorsäure 85 % angesäuert. Dazu wurden jeweils 100 µl Kalibrierung (1, 2, 3, 4 oder 5) pipettiert und anschließend gründlich vermischt. Die gesamten Lösungen (1120 µl) wurden auf Oasis Säulen aufgegeben (s.u.). Mit den Qualitätskontrollproben wurde entsprechend verfahren. Für den Blindwert wurden 900 µl Humanplasma mit 100 µl 1 N HCl, 20 µl Phosphorsäure 85 % und 100 µl Methanol versetzt. Zu 1000 µl Probandenplasma wurde 20 µl Phosphorsäure 85 % und 100 µl Stlsg. 2 ISTD pipettiert und gemischt.

Vor Probenaufgabe wurden die Oasis Kartuschen jeweils mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert. Nach Probenaufgabe wurde mit 2 x 1 ml Wasser und 2 x 1 ml Methanol 5 % gewaschen, um störende Substanzen (Proteine) abzutrennen. Anschließend wurde die Säule 1 min lang bei – 0,7 bar getrocknet und danach mit 1 ml Ethylacetat eluiert. Die organische Phase wurde unter Stickstoffbegasung bei 50 °C zur Trockne eingedampft und der Rückstand unter Zugabe von 40 µl BSTFA für 1 h bei 80 °C derivatisiert. 1 µl dieser Lösung wurden in die GC-MS injiziert.

---

### Chromatographie-Bedingungen

Die Analyse der Proben erfolgte an einem Gaschromatographen (5890 HP) gekoppelt mit einem Massenspektrometer (Trio-2000 quadrupole). Die Trennung der Substanzen erfolgte auf einer Dimethylpolysiloxan-Säule ( HP 1 column, 12 m x 0,2 mm x 0,33  $\mu$ m). Die Injektionstemperatur betrug 280 °C, die Anfangstemperatur der Säule 150 °C. Diese wurde gemäß einem Gradienten gesteigert: 20 °C / min bis zu 200 °C, 10 °C / min bis zu 280 °C, die anschließend für 6 min gehalten wurde. Helium wurde als Trägergas mit einem Druck von 50 kPa. benutzt. Die Transferleitung zum Massenspektrometer wurde auf 250 °C geheizt. Die Ionisierung wurde durch negative chemische Ionisation mithilfe von Methan durchgeführt. Die Elektronen-Energie wurde auf 70 eV und die Quellentemperatur auf 180 °C eingestellt. Die Retentionszeiten der trimethylsilylierten Derivate der Terpenlaktone waren 11,8 min, 12,6 min und 6,7 min für Ginkgolid A, B und Bilobalide und 12,0 min für Methoxy-Ginkgolid B (interner Standard).

Zur **Berechnung der Plasmakonzentrationen** wurden folgende Massen (m/z) von Einzelionen ausgewählt: für Ginkgolid A 390.2, für Ginkgolid B 344.4, für Bilobalid 380.2 und für den internen Standard 416.2. Zur Integration und Errechnung der Peakflächen, der Kalibrierung und Plasmakonzentrationen wurde Mass-Lynx-Software benutzt. Die Kalibrierung erfolgte nach der Methode der linearen Regression.

Für die drei Substanzen (Ginkgolid A, B und Bilobalid) wurden dann die relevanten pharmakokinetischen Zielgrößen berechnet. Die Auswertung der pharmakokinetischen und der klinischen Ergebnisse erfolgte rein deskriptiv. Für den direkten Vergleich der Produkte wurde aufgrund der divergierenden Gehalte an Ginkgolid A, Ginkgolid B und Bilobalid eine rechnerische Dosisanpassung vorgenommen. Diese ist wissenschaftlich gerechtfertigt durch den vorliegenden Beleg der Linearität der Pharmakokinetik der drei Substanzen (nicht publizierte Daten).

Die **kinetischen Parameter** wurden modellunabhängig für jede Behandlungsphase mit Hilfe des Programms Kinetica™ 2000 (Innaphase Corporation, 1999) berechnet. Sie wurden direkt aus den gemessenen Konzentrationen berechnet.

Die **statistische Auswertung** wurde für alle Probanden, die keine schwerwiegenden Protokoll-Abweichungen aufwiesen, nach Dosis-Normierung durchgeführt. AUC- und  $C_{\max}$ -

---

Werte wurden mit Hilfe eines multiplikativen Modelles und  $t_{\max}$  und  $t_{1/2}$  mit Hilfe eines additiven Modelles bestimmt.

Die Varianzanalyse für AUC und  $C_{\max}$  wurde unter Berücksichtigung von Formulierungs-, Perioden-, Sequenz- und interindividuellen Effekten durchgeführt. Daneben wurden intraindividuelle Unterschiede ermittelt.

Die statistische Berechnung wurde auf einem Signifikanz-Niveau von 0,05 (Fehler 1. Ordnung oder  $\alpha$ -Fehler) durchgeführt. Die Punktschätzer und die Vertrauensintervalle für AUC und  $c_{\max}$  für T/R wurden nach parametrischen und nicht-parametrischen Verfahren errechnet. Die relative Bioverfügbarkeit von Test vs. Referenz wurde durch das geometrische Mittel der einzelnen Punktschätzer ermittelt. Die 90 %-Konfidenzintervalle wurden durch parametrische Analyse (two one-sided t-tests) und parameterfreie Analyse (two one-sided Wilcoxon-Mann-Whitney tests) bestimmt. Die parameterfreien Konfidenzintervalle sind von deskriptivem Charakter und wurden nicht in die Bioäquivalenz-Entscheidung miteinbezogen.

---

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vergleich der pharmazeutischen Qualität amerikanischer Ginkgo biloba-haltiger Fertigpräparate**

#### **3.1.1 Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen**

Im Rahmen der Untersuchung der pharmazeutischen Qualität von amerikanischen Ginkgo biloba-haltigen Präparaten wurde auch die Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen überprüft.

Zur Überprüfung der Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen kann die wirkstoffbezogene oder massebezogene Dosierungsgenauigkeit bestimmt werden. Bei dem heutigen Stand der Technik ist in der Regel die Annahme gerechtfertigt, daß der Wirkstoffanteil in der Grundlage weitgehend homogen verteilt vorliegt. Dennoch sind im allgemeinen die Schwankungen des Wirkstoffgehaltes größer als die der Einzelmasse. So liegt bei großen Masseschwankungen immer der Verdacht einer Entmischung während der Verarbeitung nahe.

##### **3.1.1.1 Gleichförmigkeit der Masse**

Die Gleichförmigkeit der Masse wurde nach dem Europäischen Arzneibuch (1997) und USP 24 (weight variations of nutritional supplements) überprüft. Bis auf eine (nach USP 24) bzw. zwei Chargen (nach EUAB) verschiedener Präparate erfüllten alle die Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse (s. Tab. 5).

**Tab. 5:** Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse verschiedener amerikanischer Ginkgo-Präparate

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Chargen-Nr.	Gleichförmigkeit der Masse nach EUAB	Gleichförmigkeit der Masse nach USP 24
1	Albertsons	7E01703	entspricht	entspricht
2	Bayer	8E03056 8E03057	entspricht entspricht	entspricht entspricht
3	Celestial Seasonings	010403A	entspricht	entspricht
4	Dayton Hudson Corporation	8D05413	entspricht entspricht	entspricht entspricht
5	Fields of Nature	4801791	entspricht	entspricht
6	General Nutrition Corporation	71047	entspricht entspricht	entspricht entspricht
7	Health Care Naturals	802241P	entspricht	entspricht
8	Leiner Health Products	8E01499 8E01516	entspricht entspricht	entspricht entspricht
9	Nature Made Nutritional Products	HJ12478	entspricht entspricht	entspricht entspricht
10	Nature´s Bounty	4136812	entspricht	entspricht
11	Nature´s Resource Products	IF13085	entspricht entspricht	entspricht entspricht
12	Nature´s Way Products	808169 902527 908415 908416	entspricht entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht entspricht
13	NaturPharma	8C04774	entspricht	entspricht
14	NaturPharma	801051A	entspricht	entspricht
15	Now Foods	70564 74678P1	entspricht entspricht	entspricht entspricht
16	Pharmanex	610004 610025 610053	entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht
17	Pharmanex	610040 610059 AH25391	entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht
18	Pharmaton	FD6061A FD7276A FD8404A FD9462A	entspricht entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht entspricht
19	Rite Aid	62374 8A03130 8D03390 8E05528	entspricht entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht entspricht
20	Solgar Laboratories	4802	entspricht	entspricht
21	Sundown Vitamins	4144 6223	entspricht entspricht nicht	entspricht entspricht

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Chargen-Nr.	Gleichförmigkeit der Masse nach EUAB	Gleichförmigkeit der Masse nach USP 24
22	Sundown Vitamins	4428 6331	entspricht entspricht	entspricht entspricht
23	Trader Joe´s	2794-J8	entspricht	entspricht
24	Walgreens	IE11086 IF10313 IG11014 IG11015 II10812	entspricht entspricht entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht entspricht entspricht
25	Warner-Lambert	8F5010	entspricht	entspricht
26	Whitehall-Robins Healthcare	457-569 458-490 458-785 458-790 461-200 461-203	entspricht entspricht entspricht entspricht entspricht entspricht	entspricht entspricht entspricht entspricht entspricht entspricht
27	Whole Foods Market	T4676E04	entspricht nicht	entspricht nicht
28	Whole Foods Market	7287	entspricht	entspricht

### 3.1.1.2 Gleichförmigkeit des Gehaltes

#### 3.1.1.2.1 Fingerprint-Untersuchung des Musters von Ginkgoflavonglykosiden und anderer Inhaltsstoffe mit Hilfe der HPLC

Zur Überprüfung der Gleichförmigkeit des Gehaltes wurden verschiedene Inhaltsstoffgruppen anhand unterschiedlicher Methoden analysiert.

Mit Hilfe einer Fingerprint-Untersuchung wurden qualitative und semi-quantitative Unterschiede der US-amerikanischen Ginkgo biloba-Präparate in den Inhaltsstoffklassen Flavonglykoside, Biflavone und Ginkgolsäuren untersucht. Im Rahmen der Validierung dieser Methode wurden folgende Größen in Anlehnung an die ICH-Guidelines (J.L.Robert (CMPM), 1995) bestimmt:

- **Retentionszeiten** der beobachteten Substanzen (s. Tab. 6).

**Tab. 6:** Retentionszeiten der untersuchten Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Retentionszeit</b>	<b>Substanz</b>	<b>Retentionszeit</b>
	<b>[min]</b>		<b>[min]</b>
Rutin	28	Ginkgetin	61
Quercetin-Dihydrat	38	Isoginkgetin	62
Kämpferol	44	Sciadopytisin	69
Amentoflavon	50	Ginkgolsäure 1	84
Bilobetin	55	Ginkgolsäure 2	88

- Die **Präzision** der Methode wurde durch die Auswertung von Chromatogrammen (n = 6, jeweils als Doppelbestimmung) einer Charge des Referenzextraktes EGb 761 mit deklariertem Gehalt (% bezogen auf mg Extrakt) bestimmt (s. Tab. 7).

**Tab. 7:** Angaben zur Präzision der Methode (die LLQ für Ginkgolsäuren lag bei < 0,1 % und der Gehalt des EGb 761 unterhalb 0,0005 %, so daß für diese keine Präzision bestimmt werden konnte)

<b>Stoffgruppe</b>	<b>Gehalte</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Relative Standard- Abweichung</b>
Flavonglykosiden	22,94 %	0,95	4,12 %
Biflavonen	0,046 %	0,002	3,42 %
Ginkgolsäuren	< 0,1 %	-	-

Um **Einflüsse von Hilfstoffen** auf die Genauigkeit aufzudecken, wurde die Präzision zusätzlich durch Auswertung von Chromatogrammen eines Fertigpräparates über drei verschiedene Konzentrationen (je n = 3), bestimmt (Gehalte ausgedrückt in % bezogen auf mg Extrakt).

**Tab. 8:** Angaben zur Präzision unter Berücksichtigung von Hilfstoff-Einflüssen

Stoffgruppe	Einwaage in mg Extrakt (Mittelwert aus n = 3)	Gehalt [%] bzgl. Extrakt (Mittelwert ± SD)	Relative Standardabweichung %	Vertrauensbereich für α = 0,05
Flavonglykoside	64,06	22,79 ± 1,03	4,54	22,79 ± 1,17
	80,00	22,37 ± 1,67	7,45	22,37 ± 1,89
	95,93	20,61 ± 0,72	3,51	20,61 ± 0,82
Biflavone	64,06	0,056 ± 0,002	3,58	0,056 ± 0,002
	80,00	0,055 ± 0,004	7,38	0,055 ± 0,005
	95,93	0,052 ± 0,001	1,68	0,052 ± 0,001
Ginkgolsäuren	64,06	0,156 ± 0,018	11,51	0,156 ± 0,020
	80,00	0,167 ± 0,004	2,60	0,167 ± 0,005
	95,93	0,159 ± 0,001	0,90	0,159 ± 0,002

- Die **Tag-zu-Tag-Präzision** wurde anhand einer Charge des Referenzextraktes EGb 761 ermittelt, dessen Gehalt an Flavonglykosiden und Biflavononen an zwei verschiedenen Tagen mit jeweils n = 6 bestimmt wurde (s. Tab. 9).

**Tab. 9:** Angaben zur Tag-zu-Tag-Präzision

Stoffgruppe	Gehalt [%] bzgl. Extraktmenge (Mittelwert ± SD)	Relative Standardabweichung	Vertrauensintervall für α = 0,05
Flavonglykoside	23,09 ± 1,06	4,61	23,09 ± 0,63
Biflavone	0,044 ± 0,003	6,05	0,044 ± 0,00158

- Die **Wiederfindung** von Rutin, Amentoflavon und Ginkgolsäuren wurde durch Zumischung von drei verschiedenen Konzentrationen (n = 3, je zweifach vermessen) an Reinsubstanzen zur Plazebo-Mischung bestimmt (s. Tab. 10).

**Tab. 10:** Angaben zur Wiederfindung der Methode

Substanz /-en	Wiederfindung
	Mittelwert [%] ± SD
Rutin	105 ± 2,8
Amentoflavon	94 ± 2,7
Ginkgolsäuren	105 ± 5,0

- Zur Überprüfung der **Stabilität** methanolischer Lösungen der Inhaltsstoffe wurden drei verschiedene Fertigpräparate je zweimal aufgearbeitet und einmal sofort und ein zweites Mal nach etwa 4 - 8 Wochen (Lagerung bei 3 – 4 °C) vermessen. Die Eichgeraden wurden jeweils frisch zubereitet. Sowohl Flavonglykoside, Biflavone als auch die Ginkgolsäuren sind mindestens über einen Zeitraum von 4 - 8 Wochen bei Kühlschranklagerung (3 – 4 °C) stabil.
- Die **Flußrate** der Pumpe wurde bei einem Fluß von 1,0 ml durch volumetrisches Messen der Menge, die nach 10 min gesammelt wurde, überprüft. Die **Injektionsgenauigkeit** des Autosamplers wurde durch zehnmahlige Injektion einer Probe Rutin und Flächengrößenvergleich der erhaltenen Rutin-Peaks überprüft (Mittelwert = 3636939,782; SD = 54877,531; RSD 1,51 %).
- Die **Bestimmungsgrenze** für Ginkgolsäuren lag bei ~1000 ppm. Die **Nachweisgrenze** für Amentoflavon lag bei 260 nM/l und die Bestimmungsgrenze bei 14 µM/l mit einer RSD von < 0,2 %.
- Die **Linearität** der Eichgeraden für Rutin , Amentoflavon und Ginkgolsäure wurde durch Überprüfung der Korrelationskoeffizienten ( $r^2 > 0,997$  für Rutin und  $r^2 > 0,998$  für Amentoflavon und Ginkgolsäuren) und der Abweichungen der einzelnen Punkte von der Korrelationsgeraden (< 5 %) nachgewiesen.
- Da 211 nm zur Bestimmung der Ginkgolsäuren eine Wellenlänge ist, bei der viele Ginkgo-Extraktbestandteile absorbieren, wurde zwecks Kontrolle der **Spezifität** ein Diodenarrayspektrum von drei exemplarisch ausgewählten Präparaten aufgenommen und gezeigt, daß bei 211 nm keine weiteren Substanzen / Hilfsstoffe nach dieser Methode ein

Maximum haben. Des weiteren wurde die Spezifität durch Überprüfung des Chromatogramms einer Plazebo-Mischung zu den entsprechenden Retentionszeiten bestätigt.

Tab. 11 zeigt die semi-quantitativen Ergebnisse verschiedener Präparate nach chromatographischer Fingerprint-Untersuchung. Angegeben werden prozentuale Gehalte an Inhaltsstoffgruppen bezogen auf Extrakt. Präparate, bei denen anstelle der Extraktmenge pro Arzneiform eine Menge an Ginkgo biloba-Blättern in mg deklariert ist, wurden der Vergleichbarkeit wegen so behandelt, als hätte ein natives Droge-Extrakt-Verhältnis von 50:1 – als Mittelwert der in der Kommission-E-Monographie angegebenen Spanne 35-67:1 – vorgelegen. Diesem DEV entsprechend wurde die Blättermenge in Menge [mg] Extrakt umgerechnet. Genauso wurde verfahren mit Präparaten, die sowohl Extrakt als auch Blätter als Zumischung enthielten: die Blättermenge wurde mit einem DEV von 50:1 in Extraktmenge umgerechnet und zur deklarierten Extraktmenge addiert.

**Tab. 11:** Ergebnisse der Fingerprint-Untersuchung von US-amerikanischen Ginkgo-Präparaten, Mittelwerte aus n = 2; n.u. = nicht untersucht  
\*Gehalte wurden aufgrund der Bestimmungsgrenze der Fingerprint-Methode von > 1000 ppm mit Hilfe einer anderen, hier nicht beschriebenen Methode (vgl. DAB 2000) bestimmt

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Chargen-Nr.	Flavonglykoside %	Biflavone %	Ginkgol-säuren ppm
1	Albertsons	7E01703	19,62	0,32	373*
2	Bayer	8E03056	20,93	0,04	< 5*
		8E03057	21,75	0,04	< 5*
3	Celestial Seasonings	010403A	22,00	0,05	1619
4	Dayton Hudson Corporation	8D05413	26,62	0,06	1088
5	Fields of Nature	4801791	22,78	0,13	236*
6	General Nutrition Corporation	71047	25,68	0,08	3083
7	Health Care Naturals	802241P	26,38	0,50	47.968
8	Leiner Health Products	8E01499	24,46	0,12	563*
		8E01516	27,45	0,09	3192
9	Nature Made Nutritional Products	HJ12478	nicht untersucht	n.u.	n.u.
10	Nature´s Bounty	4136812	24,86	0,06	2991
11	Nature´s Resource Products	IF13085	26,71	0,20	7293
12	Nature´s Way Products	808169	24,34	0,05	< 5*

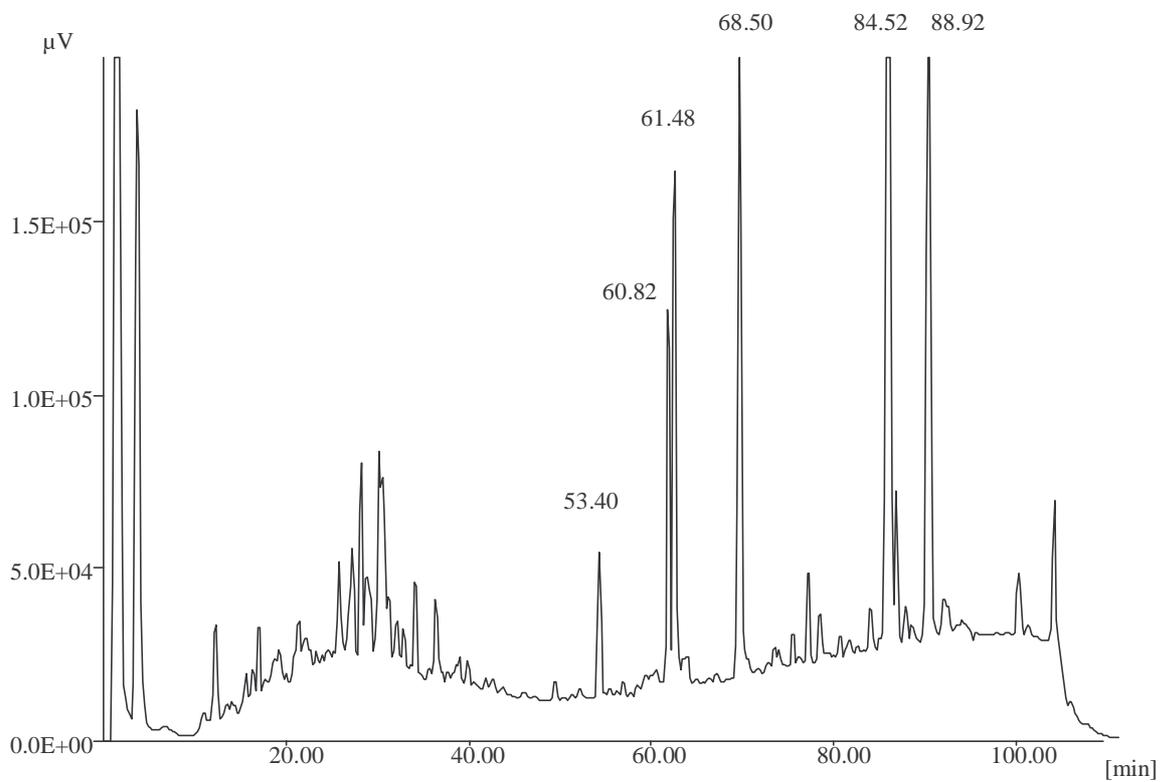
Nr.	Hersteller/Vertreiber	Chargen-Nr.	Flavonglykoside %	Biflavone %	Ginkgol-säuren ppm
13	NaturPharma	8C04774	22,35	0,13	2924
14	NaturPharma	801051A	26,89	0,13	6746
15	Now Foods	70564	23,25	0,49	27.441
		74678P1	24,80	0,88	51.226
16	Pharmanex	610004	24,47	0,07	1522
		610025	23,75	0,07	2009
		610053	22,89	0,09	3402
17	Pharmanex	610040	25,70	0,13	2924
		610059	20,48	0,06	< 5*
18	Pharmaton	FD7276A	24,79	0,05	< 5*
19	Rite Aid	8A03130	21,69	0,19	3176
		8D03390	25,41	0,19	7895
20	Solgar Laboratories	4802	24,98	1,47	> 71.000
21	Sundown Vitamins	4144	26,95	2,20	93.650
		6223	27,34	2,35	89.576
22	Sundown Vitamins	4428 6331	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
23	Trader Joe's	2794-J8	25,76	0,34	2667
24	Walgreens	IF10313	24,79	0,08	2560
		II10812	26,87	0,08	2579
25	Warner-Lambert	8F5010	24,15	0,04	< 5*
26	Whitehall-Robins Healthcare	457-569	25,96	0,08	< 5*
27	Whole Foods Market	T4676E04	25,59	0,18	8175
28	Whole Foods Market	7287	28,00	0,05	1055

Vergleicht man die durch die semi-quantitative Analyse erhaltenen Gehalte an Flavonglykosiden der verschiedenen Präparate, so bewegen sich alle Präparate in einem Bereich von 20 - 28 %, liegen also relativ nahe beieinander. Bezüglich der Biflavongehalte zeigen sich deutliche Unterschiede: die Gehalte liegen zwischen 0,04 – 2,35 %, wobei der höchste Wert das 59fache des niedrigsten Wertes ausmacht. Die Monographie der Kommission E gibt bezüglich der Biflavone keine Gehaltsgrenzen vor. Für die Ginkgolsäuren ist in der Monographie aus Toxizitätsgründen ein Grenzwert von < 5 ppm angegeben.

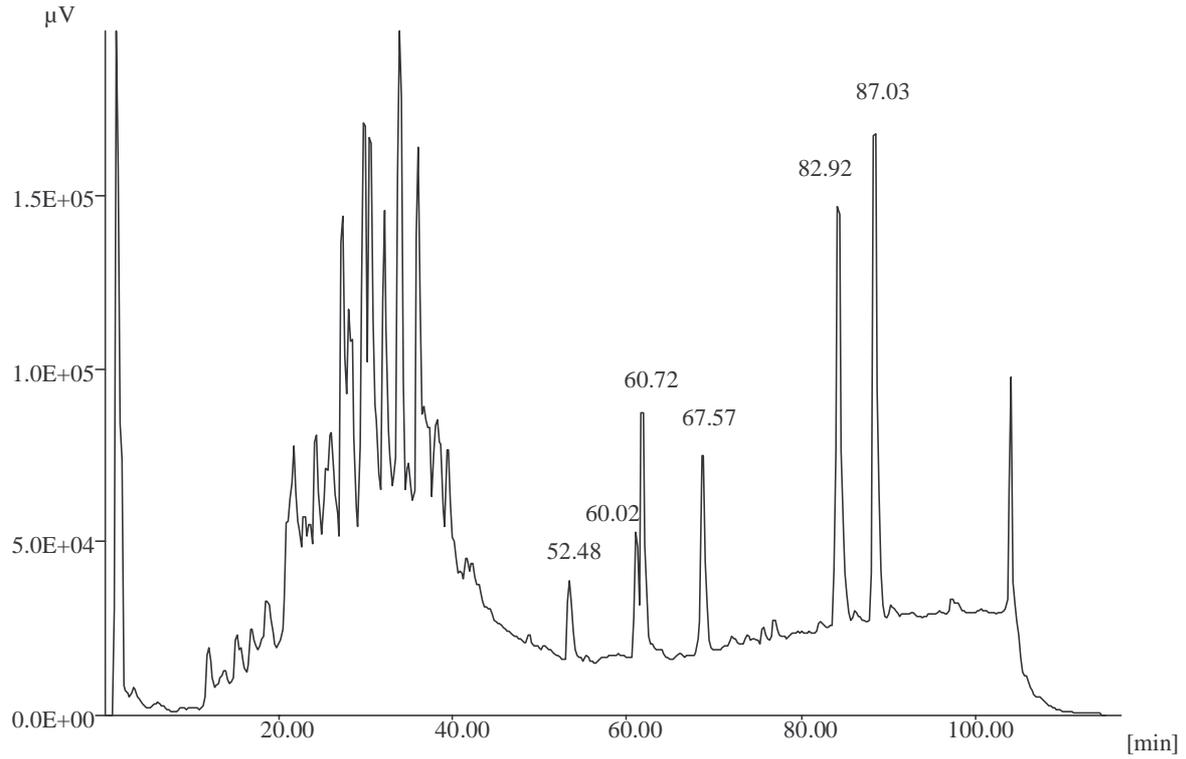
Die semi-quantitative Fingerprint-Bestimmung hat ein LLQ von etwa 1000 ppm (0,1 %). Die meisten nach diese Methode bestimmten Präparate lagen deutlich über diesem LLQ. Diejenigen Produkte, die unter dem LLQ lagen, wurden nach einer weiteren, hier nicht beschriebenen DAB-Methode (DAB 2000) mit einem LLQ von etwa 5 ppm bestimmt.

Die Mehrzahl der untersuchten amerikanischen Ginkgo biloba-haltigen Fertigpräparate entspricht nicht den Gehaltsforderungen der deutschen Monographie der Kommission E, obwohl viele dieser Präparate Bezug nehmen auf den Extrakt EGb 761, welcher der Monographie zugrunde liegt.

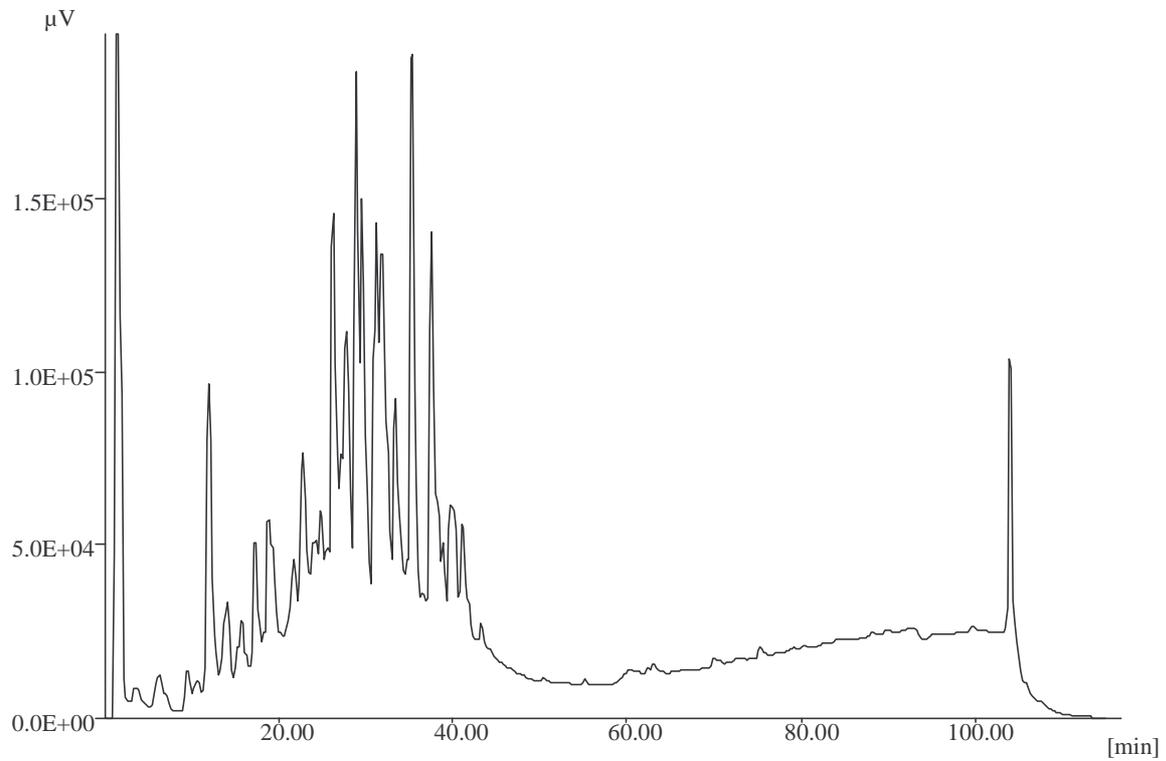
Die nach semi-quantitativer Auswertung evidenten Produktunterschiede (s. Tab. 11) kann man bereits beim Vergleich der beispielhaft angeführten Fingerprint-Chromatogramme (Abb. 22 - 24) erkennen. Die Inhaltsstoffmuster unterscheiden sich deutlich voneinander.



**Abb. 22:** Fingerprint eines reinen Blätterpräparates (Nr. 22; Ginkgo Biloba Whole Herb; kein Extrakt enthalten) bei 211 nm



**Abb. 23:** Fingerprint-Chromatogramm eines Extrakt und Blätter enthaltenden Präparates (Nr. 20; Super Ginkgo) bei 211 nm



**Abb. 24:** Fingerprint-Chromatogramm eines EGb 761 enthaltenden Präparates (Nr. 12; Ginkgold) bei 211 nm

---

In Abb. 22 – dem Chromatogramm des reinen Blätterpräparates – ist der Flavonglykosidanteil (Peaks von  $t_R$  20 min bis 45 min) im Vergleich zum EGb 761 Extrakt (Abb. 24) stark verringert, dafür der Anteil der Biflavone ( $t_R$  von ca. 50 min bis 68 min) und der der Ginkgolsäuren ( $t_R$  von 84 bis 88 min) deutlich erhöht. Durch die Verwendung von Blättern fehlt offensichtlich die durch das Extraktionsverfahren verursachte Anreicherung bzw. Abreicherung bestimmter Inhaltsstoffgruppen.

Abb. 23 zeigt das Chromatogramm eines Präparates, das sowohl Extrakt als auch Blätter enthält. Eine Anreicherung der Flavonglykosid-Fraktion hat offensichtlich durch die Extraktion stattgefunden. Die Anteile an Biflavonen und Ginkgolsäuren sind im Vergleich zu EGb 761 (Abb. 24) wesentlich höher, was entweder auf fehlende Abreicherung dieser Inhaltsstoffgruppen durch den Extraktionsprozeß oder auf den Anteil der zugesetzten Blätter zurückzuführen ist.

Das Fingerprint-Chromatogramm des EGb 761 enthaltenden Präparates in Abb. 24 zeigt einen großen Anteil an Flavonglykosiden (24%) und einen kaum sichtbaren Bereich an Biflavonen und Ginkgolsäuren (< 5 ppm). Durch das Extraktionsverfahren (s. Abb. 25) wurden diese beiden Stoffgruppen stark abgereichert und die Flavonglykoside stark angereichert. Auffallend ist der Peak bei einer Retentionszeit von ungefähr zehn Minuten, der im Chromatogramm des EGb 761-Extraktes wesentlich größer ausfällt als in den anderen beiden Chromatogrammen. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine der im Ginkgo biloba-Blatt vorhandenen organischen Säuren (Shikimisäure, Kynurensäure u. a.), die im EGb 761 möglicherweise durch den Extraktionsprozeß angereichert ist. Diese organischen Säuren, wie auch die Ginkgolsäuren, dienen als Lösungsvermittler für den relativ schlecht in Wasser löslichen Anteil des Ginkgo biloba-Extraktes, wie z.B. die Terpenlaktone.

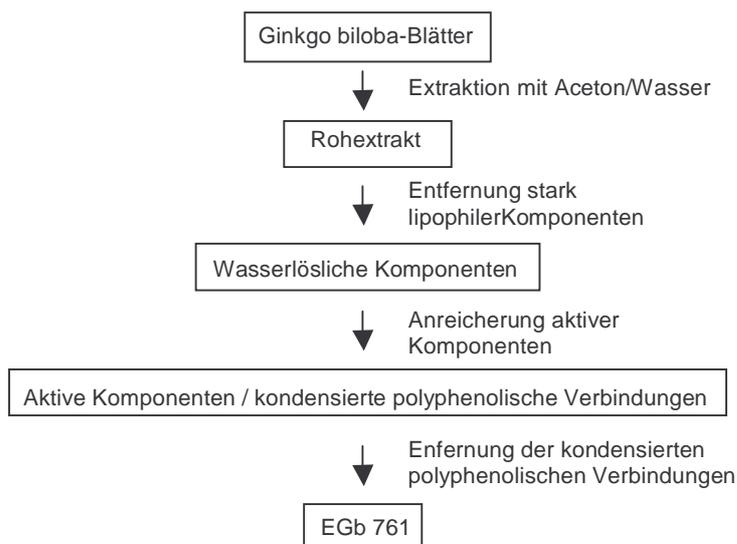


Abb. 25: Extraktionsverfahren des EGb 761

### 3.1.1.2.2 Gehaltsbestimmung der Flavonoide nach DAB 2000

Eine DAB-Methode kann als validiert gelten. Zur eigenen Kontrolle wurden im Rahmen einer Validierung in Anlehnung an die ICH 3-Guidelines (J.L.Robert (CMPM), 1995) folgende Größen ermittelt:

- Die **Retentionszeit** für Kämpferol/Isorhamnetin (Peak-Überlagerung, s. Kapitel 2.2.1.2.2) lag bei ~ 7 min und die für Quercetindihydrat bei ~ 3,9 min.
- Die **Präzision** der Methode wurde durch die Auswertung von Chromatogrammen (n = 6, jeweils als Doppelbestimmung) einer Charge des Referenzextraktes EGb 761 mit deklariertem Gehalt (% bezogen auf mg Extrakt) bestimmt:  
25,16 % ± 0,43 % (RSD = 1,7 %), Vertrauensintervall für  $\alpha=0,05$ : 25,16 % ± 0,24 %.
- Die **Richtigkeit** der Methode wurde durch Bestimmung des Gehaltes von je drei Einwaagen in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen eines Fertigpräparates bestimmt, dessen Gehalt deklariert und bekannt ist:

Einwaage in mg Extrakt (Mittelwert aus n = 3)	Gehalt [%] bzgl. Extrakt (Mittelwert ± SD)	Relative Standard- abweichung %	Vertrauens- bereich für $\alpha = 0,05$
23,95	24,17 ± 0,42	1,76	24,17 ± 0,34
39,94	24,16 ± 1,90	7,88	24,16 ± 1,52
52,32	24,79 ± 0,55	2,21	24,79 ± 0,44

- Die prozentuale **Wiederfindung** bezogen auf die deklarierte Menge betrug 101,54 %.
- Die **Tag-zu-Tag-Präzision** wurde anhand einer Charge des Referenzextraktes EGb 761 ermittelt, dessen Gehalt an Flavonglykosiden an zwei verschiedenen Tagen mit jeweils n = 6 bestimmt wurde:  
24,22 % ± 1,11 % (RSD = 4,57 %), Vertrauensintervall für  $\alpha = 0,05$ : 24,22 % ± 0,44 %.
- Die **Bestimmungsgrenze** für Quercetindihydrat lag bei 1856  $\mu\text{mol/l}$  und die Nachweisgrenze bei 465  $\mu\text{mol/l}$ .
- Die **Linearität** der Quercetindihydrat-Kalibriergerade wurde durch den Korrelationskoeffizienten  $r^2 > 0,998$  und Abweichung der einzelnen Punkte von der Korrelationsgeraden (< 5 %) überprüft.

Die Ergebnisse nach der DAB 2000-Methode (s. Tab. 12) zeigen Flavonglykosid-Gehalte zwischen 24 % - 36 % bezüglich Extrakt. Die Mehrzahl der untersuchten Präparat überschreitet die auf der Verpackung deklarierte Menge absolut um mehr als ein Prozentpunkt.

**Tab. 12:** Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der Flavonglykoside in US-amerikanischen Ginkgo-Produkten (\* 400 mg Blätter entsprechen bei einem DEV von 50:1 8 mg Extrakt; die 40 mg Extrakt entsprechende Menge an Blättern (2000 mg) wäre mit dieser Methode nicht zu extrahieren gewesen.)

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Chargen-Nr.	Standardisierung auf % Flavonglykoside	Gehalt in %, (n)
1	Albertsons	7E01703	24	25,49 ± 0,82, (6)
2	Bayer	8E03056 8E03057	keine Angabe	24,25 ± 0,91, (16) 24,92 ± 0,66, (12)
3	Celestial Seasonings	010403A	24	25,11 ± 0,81, (6)
4	Dayton Hudson Corporation	8D05413	24	32,79 ± 0,83, (6)
5	Fields of Nature	4801791	24	26,12 ± 0,67, (6)
6	General Nutrition Corporation	71047	24	27,69 ± 0,33, (12)
7	Health Care Naturals	802241P	24	32,12 ± 1,72, (18)
8	Leiner Health Products	8E01499 8E01516	24	28,59 ± 0,91, (10) 29,82 ± 0,84, (12)
9	Nature Made Nutritional Products	HJ12478	24	nicht untersucht
10	Nature´s Bounty	4136812	24	24,60 ± 0,27, (6)
11	Nature´s Resource Products	IF13085	24	26,80 ± 0,82, (12)
12	Nature´s Way Products	808169 902527 908415 908416	24	24,59 ± 0,57, (6) 24,37 ± 1,14, (6) 26,05 ± 0,08, (6) 26,03 ± 0,05, (4)
13	NaturPharma	8C04774	24	25,77 ± 0,58, (6)
14	NaturPharma	801051A	24	25,45 ± 0,84, (6)
15	Now Foods	70564 74678P1	24	24,54 ± 0,39, (6) 29,37 ± 0,75, (6)
16	Pharmanex	610004 610025 610053	24	26,71 ± 0,62, (6) 26,16 ± 0,45, (6) 27,50 ± 0,42, (6)
17	Pharmanex	610040 610059	27	29,26 ± 0,47, (10) 26,21 ± 0,96, (12)
18	Pharmaton	FD6061A FD7276A FD8404A	keine Angabe	24,41 ± 0,45, (4) 23,88 ± 0,21, (6) 24,20 ± 0,20, (6)
19	Rite Aid	8A03130 8D03390 8E05528	24	27,64 ± 0,73, (6) 28,94 ± 0,66, (4) 29,86 ± 1,06, (6)
20	Solgar Laboratories	4802	Extrakt (24 %) + Blätter	27,00 ± 0,92, (6)

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Chargen-Nr.	Standardisierung auf % Flavonglykoside	Gehalt in %, (n)
21	Sundown Vitamins	4144 6223	24	36,07 ± 1,24, (6) 35,54 ± 1,03, (6)
22	Sundown Vitamins	4428 6331	keine Angabe	nicht bestimmbar*
23	Trader Joe´s	2794-J8	24	30,34 ± 0,62, (6)
24	Walgreens	IE11086 IF10313 II10812	24	30,06 ± 0,88, (6) 29,39 ± 0,27, (6) 29,38 ± 1,32, (6)
25	Warner-Lambert	8F5010	24	24,74 ± 0,31, (6)
26	Whitehall-Robins Healthcare	457-569 458-790	24	29,41 ± 1,89, (18) 32,19 ± 0,31, (6)
27	Whole Foods Market	T4676E04	24	27,13 ± 0,57, (10)
28	Whole Foods Market	7287	27	28,98 ± 0,71, (12)

Die Kommission E hat in ihrer Monographie „Ginkgo-biloba-Blätter, Trockenextrakt“ eine Spanne von 22 % - 27 % Flavonglykosidgehalt zugelassen. Nur etwa die Hälfte der untersuchten US-amerikanischen Präparate bzw. Chargen erfüllt diese in der Monographie genannte Spezifikation des Flavonglykosid-Gehaltes, obwohl viele Präparate in ihrer Deklaration auf EGb 761, der der Kommission E-Monographie zugrunde liegt, und dessen Indikationen Bezug nehmen. Allerdings besitzt die Kommission E-Monographie für amerikanische Produkte keine Gültigkeit. Wenn jedoch auf sie Bezug genommen wird, sollten auch deren Spezifikationen erfüllt sein.

### 3.1.1.2.3 Gehaltsbestimmung der Terpenlaktone nach DAB 2000

Als weitere große, pharmakologisch wichtige Inhaltsstoffgruppe sind die Terpenlaktone zu nennen. Die Gehalte der verschiedenen Präparate an Terpenlaktonen wurden nach einer offiziellen Methode (DAB 2000) bestimmt, die als validiert gilt. Zur eigenen Kontrolle wurden trotzdem im Rahmen einer Validierung in Anlehnung an die ICH-Guidelines (J.L.Robert (CMPM), 1995) folgende Größen bestimmt:

- Die **Retentionszeiten** der untersuchten Stoffe sind in Tab. 13 zusammengestellt.

**Tab. 13:** Retentionszeiten der einzelnen Terpenlaktone und der Eichsubstanz Benzylalkohol

<b>Substanz</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>
Benzylalkohol	7,8
Ginkgolid C	8,8
Bilobalid	10,3
Ginkgolid A	12,9
Ginkgolid B	16,5

- Die **Präzision** der Methode wurde durch die Auswertung von Chromatogrammen (n = 6, jeweils als Doppelbestimmung) des Standardextraktes EGb 761 mit bekanntem Gehalt (% bezogen auf den Extrakt) bestimmt (s. Tab. 14).

**Tab. 14:** Angaben zur Präzision der Methode

<b>Stoffgruppe</b>	<b>Gehalt [%] bzgl. Extraktmenge Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Relative Standard-abweichung %</b>	<b>Vertrauensbereich für <math>\alpha = 0,05</math></b>
Ginkgolid A	1,36 $\pm$ 0,04	2,90	1,36 $\pm$ 0,02
Ginkgolid B	0,85 $\pm$ 0,09	11,00	0,85 $\pm$ 0,05
Ginkgolid C	1,28 $\pm$ 0,01	0,80	1,28 $\pm$ 0,003
Bilobalid	2,57 $\pm$ 0,02	0,80	2,57 $\pm$ 0,01

Um **Einflüsse von Hilfsstoffen** auf die Genauigkeit aufzudecken, wurde die Präzision zusätzlich durch Auswertung von Chromatogrammen eines Fertigpräparates in sechsfacher Einwaage und Doppelbestimmung in der HPLC bestimmt (Gehalte ausgedrückt in % bezogen auf den Extrakt) (s. Tab. 15).

**Tab. 15:** Angaben zur Präzision unter Berücksichtigung von Hilfsstoff-Einflüssen

<b>Stoffgruppe</b>	<b>Gehalt [%] bzgl. Extraktmenge Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	<b>Relative Standard-abweichung %</b>	<b>Vertrauensbereich für <math>\alpha = 0,05</math></b>
Ginkgolid A	1,38 $\pm$ 0,03	2,20	1,38 $\pm$ 0,01
Ginkgolid B	0,43 $\pm$ 0,03	7,00	0,43 $\pm$ 0,02
Ginkgolid C	1,27 $\pm$ 0,02	1,60	1,27 $\pm$ 0,01
Bilobalid	2,80 $\pm$ 0,06	2,10	2,80 $\pm$ 0,03

- Die **Richtigkeit** der Methode wurde bestimmt anhand der Doppelbestimmung dreier verschiedener Konzentrationen (n = 3) eines Fertigpräparates, das EGb 761 enthält und dessen Gehalte deklariert sind (s. Tab. 16).

**Tab. 16:** Angaben zur Richtigkeit der Methode

Stoffgruppe	Einwaage in mg Extrakt (Mittelwert aus n = 3)	Gehalt [%] bzgl. Extrakt (Mittelwert ± SD)	Relative Standardabweichung %	Vertrauensbereich für α = 0,05	Wiederfindung %
Ginkgolid A	63,97	1,47 ± 0,03	2,06	1,47 ± 0,02	111,14
	79,91	1,48 ± 0,02	1,19	1,48 ± 0,01	112,03
	95,93	1,47 ± 0,02	1,47	1,47 ± 0,02	111,47
Ginkgolid B	63,97	0,60 ± 0,05	7,84	0,60 ± 0,04	77,87
	79,91	0,69 ± 0,05	7,88	0,69 ± 0,04	89,21
	95,93	0,75 ± 0,11	15,09	0,75 ± 0,09	97,79
Ginkgolid C	63,97	1,24 ± 0,02	1,37	1,24 ± 0,01	97,93
	79,91	1,26 ± 0,02	1,36	1,26 ± 0,01	99,02
	95,93	1,28 ± 0,01	1,03	1,28 ± 0,01	101,06
Bilobalid	63,97	2,82 ± 0,07	2,34	2,82 ± 0,05	106,24
	79,91	2,89 ± 0,02	0,68	2,89 ± 0,02	109,08
	95,93	2,90 ± 0,02	0,67	2,90 ± 0,02	109,49

- Die **Tag-zu-Tag-Präzision** wurde durch Vermessen von sechs Einwaagen an EGb 761 an zwei verschiedenen Tagen ermittelt (s. Tab. 17).

**Tab. 17:** Angaben zur Tag-zu-Tag-Präzision

Substanz	Gehalt [%] bzgl. Extraktmenge Mittelwert ± SD	Relative Standardabweichung	Vertrauensbereich für α = 0,05
Ginkgolid A	1,32 ± 0,05	4,21	1,32 ± 0,02
Ginkgolid B	0,86 ± 0,10	0,10	0,86 ± 0,02
Ginkgolid C	1,30 ± 0,02	1,60	1,30 ± 0,008
Bilobalid	2,55 ± 0,03	1,25	2,55 ± 0,01

- 
- Die **Nachweisgrenze** für Benzylalkohol lag bei 74  $\mu\text{mol/l}$  und die **Bestimmungsgrenze** bei 370  $\mu\text{mol/l}$ .
  - Die **Linearität** der Benzylalkohol-Eichgerade wurde durch Überprüfung des Korrelationskoeffizienten  $r^2 > 0,9996$  und Abweichung der einzelnen Punkte von der Korrelationsgeraden ( $< 5 \%$ ) nachgewiesen.

Tab. 18 stellt die Gehalte der Terpenlaktone insgesamt und aufgeschlüsselt nach Ginkgolid A, B, C und Bilobalid dar. Legt man die Spezifikationen der Kommission E-Monographie zugrunde, die für Bilobalid eine Spanne von 2,6 – 3,2 % und für die Summe der Ginkgolide A, B und C eine Spanne von 2,8 - 3,4 % vorsieht, so erfüllen die wenigsten der hier untersuchten Präparate die Anforderungen der Monographie. 29 von 45 untersuchten Chargen entsprachen aufgrund des Gehaltes an Bilobalid den Anforderungen nicht: in den meisten Fällen wurde der erforderliche Gehalt unterschritten (23 von 29). Bezüglich der Spanne für die Summe der Ginkgolide A, B und C entsprachen 30 der 45 Produktchargen den Spezifikationen nicht: in allen Fällen wurde diese Spanne – zum Teil deutlich - überschritten. Auch hier ist zu sagen, daß die Spezifikationen der Kommission E-Monographie für amerikanische Produkte keine Gültigkeit besitzt. Aufgrund der Bezugnahme amerikanischer Produkte auf EGb 761 wurde ein Vergleich mit dessen Spezifikationen angestellt.

**Tab. 18:** Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der Terpenlaktone von US-amerikanischen Ginkgo-Präparaten  
n = Zahl der Einwaagen \* 2 (Doppelbestimmung)

Nr.	Hersteller/ Vertreiber	Chargen-Nr.	Ginkgolid A %	Ginkgolid B %	Ginkgolid C %	Summe GKA, B, C %	Bilobalid %	Gesamt-Terpen- laktone %	n
	Spezifikation nach Kommission E					2,8 – 3,4	2,6 – 3,2	5 – 7	
1	Albertsons	7E01703	2,63 ± 0,46	1,07 ± 0,25	1,40 ± 0,23	5,10 ± 0,88	1,83 ± 0,31	6,93 ± 1,18	18
2	Bayer	8E03056 8E03057	1,18 ± 0,16 1,79 ± 0,09	0,84 ± 0,22 0,63 ± 0,04	1,12 ± 0,12 1,54 ± 0,05	3,14 ± 0,32 3,97 ± 0,13	1,65 ± 0,24 2,57 ± 0,12	4,79 ± 0,49 6,53 ± 0,25	12 6
3	Celestial Seasonings	010403A	2,98 ± 0,10	1,70 ± 0,07	1,98 ± 0,07	6,65 ± 0,16	3,77 ± 0,16	10,42 ± 0,30	6
4	Dayton Hudson Corporation	8D05413	3,66 ± 0,79	2,00 ± 0,37	0,82 ± 0,13	6,48 ± 1,17	1,17 ± 0,25	7,65 ± 1,40	12
5	Fields of Nature	4801791	2,62 ± 0,10	1,65 ± 0,63	1,55 ± 0,21	5,81 ± 0,85	2,03 ± 0,14	7,85 ± 0,96	12
6	General Nutrition Corporation	71047	2,39 ± 0,65	1,51 ± 0,81	1,64 ± 0,44	5,54 ± 1,76	3,20 ± 0,91	8,74 ± 2,65	12
7	Health Care Naturals	802241P	2,95 ± 0,15	1,20 ± 0,31	1,85 ± 0,08	6,00 ± 0,26	4,56 ± 0,16	10,57 ± 0,30	12
8	Leiner Health Products	8E01499 8E01516	1,68 ± 0,33 2,11 ± 0,68	1,07 ± 0,51 1,42 ± 0,61	1,11 ± 0,20 1,45 ± 0,37	3,86 ± 0,96 4,98 ± 1,44	1,36 ± 0,32 2,50 ± 0,81	5,23 ± 1,25 7,48 ± 2,20	12 12
9	Nature Made Nutritional Products	HJ12478	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	
10	Nature's Bounty	4136812	2,42 ± 0,42	1,55 ± 0,60	1,73 ± 0,30	5,70 ± 1,21	3,20 ± 0,59	8,91 ± 1,78	12
11	Nature's Resource Products	IF13085	2,65 ± 0,17	1,50 ± 0,55	1,44 ± 0,10	5,59 ± 0,72	2,23 ± 0,16	7,82 ± 0,83	12
12	Nature's Way Products	808169 902527 908415 908416	1,34 ± 0,07 1,18 ± 0,11 1,36 ± 0,01 1,34 ± 0,01	0,63 ± 0,09 0,64 ± 0,15 0,48 ± 0,01 0,48 ± 0,00	1,26 ± 0,06 1,11 ± 0,17 1,35 ± 0,03 1,32 ± 0,02	3,24 ± 0,16 2,93 ± 0,22 3,19 ± 0,04 3,13 ± 0,01	2,71 ± 0,24 2,70 ± 0,15 3,04 ± 0,05 2,96 ± 0,02	5,97 ± 0,27 5,63 ± 0,35 6,22 ± 0,08 6,08 ± 0,03	6 16 2 3
13	NaturPharma	8C04774	2,26 ± 0,24	0,98 ± 0,10	1,53 ± 0,09	4,77 ± 0,38	1,84 ± 0,15	6,61 ± 0,53	12
14	NaturPharma	801051A	2,37 ± 0,14	1,04 ± 0,06	1,09 ± 0,02	4,50 ± 0,20	0,80 ± 0,02	5,30 ± 0,23	6

Nr.	Hersteller/ Vertreiber	Chargen-Nr.	Ginkgolid A %	Ginkgolid B %	Ginkgolid C %	Summe GKA, B, C %	Bilobalid %	Gesamt-Terpen- laktone %	n
	Spezifikation Kommission E						2,6 – 3,2	5 – 7	
15	Now Foods	70564	2,12 ± 0,37	1,51 ± 0,81	1,09 ± 0,35	3,38 ± 0,96	1,97 ± 0,86	6,91 ± 1,16	12
		74678P1	2,54 ± 0,12	1,10 ± 0,06	0,79 ± 0,03	4,43 ± 0,19	2,39 ± 0,10	6,82 ± 0,28	6
16	Pharmanex	610004	2,64 ± 0,04	1,14 ± 0,06	1,23 ± 0,02	5,00 ± 0,09	1,61 ± 0,04	6,61 ± 0,12	6
		610025	2,81 ± 0,01	1,52 ± 0,09	2,19 ± 0,01	6,52 ± 0,09	1,92 ± 0,01	8,44 ± 0,09	6
		610053	2,90 ± 0,13	1,24 ± 0,01	1,44 ± 0,02	5,59 ± 0,14	1,82 ± 0,05	7,41 ± 0,17	6
17	Pharmanex	610040	3,16 ± 0,06	1,60 ± 0,13	2,35 ± 0,07	7,11 ± 0,16	3,67 ± 0,08	10,79 ± 0,22	6
		610059	3,20 ± 0,03	0,95 ± 0,01	1,66 ± 0,03	5,81 ± 0,03	2,48 ± 0,04	8,30 ± 0,07	6
18	Pharmaton	FD6061A	1,23 ± 0,06	0,57 ± 0,08	1,18 ± 0,04	2,97 ± 0,11	2,53 ± 0,09	5,50 ± 0,17	12
		FD7276A	1,46 ± 0,06	0,54 ± 0,07	1,14 ± 0,06	3,14 ± 0,16	2,75 ± 0,15	5,88 ± 0,30	6
		FD8404A	1,33 ± 0,03	0,50 ± 0,11	1,16 ± 0,02	2,98 ± 0,14	2,61 ± 0,05	5,59 ± 0,18	6
19	Rite Aid	8A03130	2,11 ± 0,48	0,83 ± 0,16	0,94 ± 0,17	3,89 ± 0,80	1,04 ± 0,25	4,93 ± 1,04	12
		8D03390	3,33 ± 0,04	1,61 ± 0,11	2,00 ± 0,03	6,94 ± 0,13	1,59 ± 0,04	8,53 ± 0,16	6
		8E05528	2,78 ± 0,15	1,00 ± 0,07	1,03 ± 0,06	4,82 ± 0,26	0,97 ± 0,04	5,79 ± 0,30	6
20	Solgar Laboratories	4802	3,38 ± 0,07	1,51 ± 0,12	1,40 ± 0,04	6,28 ± 0,17	1,55 ± 0,05	7,84 ± 0,20	6
21	Sundown Vitamins	4144	2,48 ± 0,28	1,30 ± 0,27	1,67 ± 0,20	5,46 ± 0,62	0,43 ± 0,05	5,89 ± 0,66	12
		6223	3,82 ± 0,04	1,83 ± 0,15	2,31 ± 0,08	7,96 ± 0,21	3,35 ± 0,04	11,31 ± 0,17	6
22	Sundown Vitamins	4428 6331	<Eichgerade <Eichgerade	<Eichgerade <Eichgerade	<Eichgerade <Eichgerade		2,60 ± 0,55 2,31 ± 0,35		6 6
23	Trader Joe's	2794-J8	3,50 ± 0,18	1,33 ± 0,22	1,51 ± 0,05	6,35 ± 0,42	1,39 ± 0,03	7,74 ± 0,43	6
24	Walgreens	IE11086	3,61 ± 0,18	1,85 ± 0,25	2,29 ± 0,10	7,76 ± 0,38	2,43 ± 0,20	10,19 ± 0,55	12
		IF10313	3,09 ± 0,18	1,39 ± 0,08	1,12 ± 0,03	5,60 ± 0,28	4,00 ± 0,22	9,60 ± 0,49	6
		II10812	3,24 ± 0,14	1,36 ± 0,09	2,21 ± 0,10	6,81 ± 0,32	4,18 ± 0,21	10,99 ± 0,53	6
25	Warner-Lambert	8F5010	1,31 ± 0,02	0,45 ± 0,06	1,12 ± 0,03	2,88 ± 0,08	2,62 ± 0,06	5,50 ± 0,13	6
26	Whitehall-Robins Healthcare	457-569	1,01 ± 0,33	0,75 ± 0,10	0,81 ± 0,27	2,57 ± 0,65	1,31 ± 0,45	3,87 ± 1,09	6
		458-790	1,32 ± 0,12	1,23 ± 0,05	1,49 ± 0,09	4,04 ± 0,24	2,28 ± 0,19	6,31 ± 0,43	6
27	Whole Foods Market	T4676E04	3,62 ± 0,17	1,75 ± 0,13	2,08 ± 0,12	7,45 ± 0,39	1,81 ± 0,10	9,27 ± 0,49	6
28	Whole Foods Market	7287	3,28 ± 0,04	1,87 ± 0,04	1,16 ± 0,02	6,31 ± 0,08	3,15 ± 0,06	9,46 ± 0,13	6

---

### 3.1.2 Freisetungsverhalten ausgewählter Ginkgo-Präparate des amerikanischen Marktes

Eine Auswahl der zur Verfügung stehenden Präparate wurde auf ihr *in vitro*-Verhalten getestet. Die Validierung der Freisetzungsgeschwindigkeit erfolgte gemäß den Vorschriften der USP 23.

Unter den zu testenden Präparaten befanden sich einige Kapselpräparate. Die für Kapseln vorgesehene Freisetzung im Basket konnte in Rahmen dieser Untersuchungen nicht durchgeführt werden. Das Freisetzungsverhalten einer einzelnen Kapsel konnte per HPLC aufgrund der Nachweisgrenze und der sehr geringen Gehalte an Terpenlaktone nicht verfolgt werden. Eine Erhöhung der Kapselanzahl im Basket hätte eine eklatante Veränderung der Strömungsverhältnisse zur Folge, so daß diese nicht mehr den Freisetzungsbedingungen der USP-Vorschrift entsprächen. Infolgedessen wurden die Kapseln mit geeigneter Beschwerung gegen das Aufschwimmen in der Paddle-Apparatur auf ihr Freisetzungsverhalten untersucht.

Tab. 19 zeigt die Ergebnisse zur Freisetzungsgeschwindigkeit bei pH = 1 in der Paddle-Apparatur. Es zeigt sich, daß das Gros der untersuchten Präparate den Wirkstoff schnell freisetzt. Bis auf drei Präparate (Nature's Bounty, Solgar Laboratories und Whitehall-Robins Healthcare) setzten alle mehr als 75 % in 30 min frei.

**Tab. 19:** Ergebnisse der *in vitro*-Freisetzung mit Hilfe der Paddle-Apparatur bei pH = 1 (Die Kapseln wurden zur Beschleunigung mit zwei Windungen Lötzinn umwickelt)

Hersteller/ Vertreiber	Chargen- Nr.	Arznei- form	Zeitpunkt der Proben- ziehung nach min	Ginkgolid A %	Ginkgolid B %	Ginkgolid C %	Bilobalid %	Gesamt- Terpen- lactone %	Flavon- glykoside %	n
Bayer	8E03057	Tbl.	15	90,62 ± 4,19	83,73 ± 8,55	95,45 ± 3,53	98,27 ± 1,42	92,02	97,41 ± 3,57	6
			30	93,35 ± 3,92	78,00 ± 10,26	97,20 ± 1,95	100,47 ± 4,23	92,26	98,51 ± 2,17	
			60	93,79 ± 2,58	94,31 ± 2,58	93,60 ± 2,74	103,29 ± 1,16	96,25	96,25 ± 2,57	
Celestial Seasonings	010403A	Kps.	15	83,40 ± 2,22	79,10 ± 4,76	81,67 ± 7,61	86,85 ± 1,95	82,76	82,63 ± 3,64	6
			30	91,50 ± 3,86	89,96 ± 5,76	91,78 ± 1,60	93,84 ± 1,46	92,52	92,56 ± 1,94	
			60	96,54 ± 3,46	95,53 ± 3,47	91,17 ± 4,18	98,33 ± 2,76	95,39	94,07 ± 1,93	
Fields of Nature	4801791	Tbl.	15	85,68 ± 8,29	69,38 ± 7,58	87,99 ± 7,55	89,40 ± 8,49	83,69	81,41 ± 8,15	12
			30	96,95 ± 3,24	81,74 ± 2,93	97,47 ± 3,57	98,81 ± 2,62	93,76	93,71 ± 2,51	
			60	97,19 ± 2,16	93,20 ± 6,55	95,52 ± 2,78	98,32 ± 2,73	94,71	94,70 ± 3,05	
General Nutrition Corporation	71047	Tbl.	15	103,56 ± 3,70	93,15 ± 5,24	100,25 ± 2,02	101,35 ± 3,51	99,58	95,73 ± 1,06	6
			30	102,87 ± 1,49	90,53 ± 7,07	98,28 ± 2,42	100,60 ± 1,43	98,07	97,56 ± 0,54	
			60	99,22 ± 1,06	94,26 ± 5,52	100,37 ± 2,30	97,14 ± 1,59	97,75	95,60 ± 0,49	
Nature's Bounty	4136812	Tbl.	15	23,14 ± 2,82	17,01 ± 4,12	23,40 ± 1,38	33,26 ± 3,09	24,20	24,84 ± 1,94	12
			30	69,45 ± 8,51	66,86 ± 10,73	71,46 ± 8,95	78,59 ± 8,58	71,59	69,77 ± 7,12	
			60	95,05 ± 3,21	92,06 ± 3,95	94,62 ± 4,31	96,36 ± 3,00	94,53	91,60 ± 3,14	
NaturPharma	801051A	Kps.	15	88,88 ± 2,03	90,71 ± 6,79	83,19 ± 3,10	88,03 ± 6,60	87,70	85,10 ± 3,03	6
			30	97,72 ± 4,13	97,35 ± 4,15	89,67 ± 2,30	95,69 ± 5,85	95,11	91,87 ± 2,30	
			60	98,44 ± 3,22	100,41 ± 8,26	93,97 ± 3,54	97,51 ± 11,64	97,58	93,13 ± 1,08	
Now Foods	70564	Kps.	15	87,86 ± 5,97	81,14 ± 5,38	97,13 ± 5,75	95,95 ± 4,35	90,52	98,92 ± 5,44	6
			30	92,42 ± 9,88	93,17 ± 13,17	98,78 ± 5,11	102,77 ± 7,64	96,79	103,90 ± 4,14	
			60	87,14 ± 4,15	87,69 ± 5,87	95,60 ± 3,26	97,64 ± 0,57	92,02	100,30 ± 2,48	
Pharmaton	FD6061A	Tbl.	15	93,67 ± 2,64	94,56 ± 1,56	96,58 ± 2,94	95,20 ± 3,46	95,00	94,47 ± 0,97	6
			30	99,85 ± 1,75	98,25 ± 1,10	97,34 ± 1,23	100,94 ± 1,98	99,10	99,55 ± 0,17	
			60	99,14 ± 2,10	98,37 ± 1,96	98,54 ± 1,54	99,65 ± 2,65	98,93	98,94 ± 0,47	

Hersteller/ Vertreiber	Chargen- Nr.	Arznei- form	Zeitpunkt der Proben- ziehung nach min	Ginkgolid A %	Ginkgolid B %	Ginkgolid C %	Bilobalid %		Gesamt- Terpen- lactone %	Flavon- glykoside %	n
Pharmanex	610004	Tbl.	15	61,10 ± 23,61	50,33 ± 21,78	65,37 ± 23,28	62,69 ± 17,35	52,17	53,36 ± 20,45	12	
			30	81,52 ± 12,32	72,07 ± 10,99	83,60 ± 12,78	86,26 ± 10,72	80,61	77,43 ± 12,46		
			60	95,83 ± 2,31	89,04 ± 5,07	96,76 ± 5,77	98,57 ± 3,53	95,04	96,48 ± 1,23		
Rite Aid	62374	Tbl.	15	90,64 ± 4,88	90,82 ± 6,25	94,33 ± 6,21	96,20 ± 5,65	94,55	83,77 ± 4,32	12	
			30	98,81 ± 5,57	99,93 ± 6,32	101,27 ± 5,27	102,19 ± 5,61	100,55	93,56 ± 3,21		
			60	100,93 ± 5,10	105,80 ± 5,47	103,84 ± 4,07	102,16 ± 4,05	103,18	95,21 ± 1,96		
Sundown Vitamins	6223	Kps.	15	89,71 ± 2,22	81,67 ± 2,68	95,82 ± 2,33	90,92 ± 5,00	89,53	89,49 ± 1,87	6	
			30	96,25 ± 5,02	96,46 ± 5,33	100,65 ± 5,39	99,49 ± 4,89	98,21	95,69 ± 1,85		
			60	96,44 ± 3,41	94,32 ± 8,33	90,28 ± 4,18	95,61 ± 2,05	94,16	93,53 ± 2,61		
Solgar Laboratories	4802	Kps.	15	31,01 ± 2,02	28,28 ± 1,82	33,45 ± 3,09	34,36 ± 2,59	31,78	34,66 ± 1,33	6	
			30	66,14 ± 1,93	62,88 ± 2,43	70,81 ± 2,37	73,47 ± 1,15	68,33	70,51 ± 1,55		
			60	85,99 ± 1,75	83,00 ± 4,98	90,68 ± 2,89	96,10 ± 3,86	88,99	88,34 ± 3,36		
Walgreens	IG11014	Tbl.	15	100,70 ± 1,43	95,08 ± 5,77	105,70 ± 2,05	101,37 ± 3,49	100,71	98,12 ± 1,68	6	
			30	105,44 ± 4,44	100,98 ± 3,87	104,56 ± 2,75	104,48 ± 3,99	103,87	103,08 ± 1,82		
			60	101,15 ± 2,54	101,29 ± 6,81	103,38 ± 4,71	98,80 ± 3,24	101,16	100,47 ± 1,74		
Whitehall- Robins Healthcare	458-790	Kps.	15	1,82 ± 1,01	unterhalb der	4,03 ± 2,03	5,00 ± 1,49	3,62	5,46 ± 0,87	6	
			30	7,09 ± 1,32	Nachweis-	7,81 ± 1,41	10,08 ± 1,42	8,33	11,00 ± 1,41		
			60	10,12 ± 1,83	grenze	14,48 ± 1,64	19,26 ± 1,95	14,62	20,25 ± 1,71		

Abb. 26 stellt die Freisetzungprofile dreier unterschiedlich schnell freisetzender Präparate (langsam, mittelschnell und schnell) gegenüber.

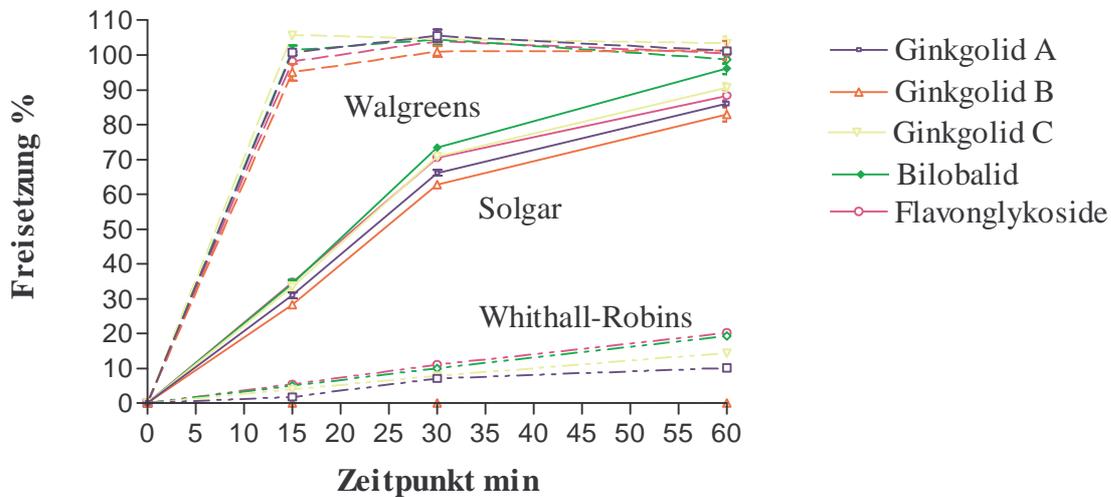


Abb. 26: Freisetzungprofile (pH = 1) dreier deutlich unterschiedlich schnell freisetzender Präparate, Mittelwertkurven aus n = 6

Eines davon (Whithall-Robins Healthcare) setzte auch bis zum Zeitpunkt 60 min gerade einmal 20 % frei. Bei diesem Präparat handelte es sich um ein Kapsel-Präparat, welches den Extrakt in Form eines Granulates enthielt. Dieses Granulat löste sich rein optisch schon nicht im untersuchten Zeitrahmen auf.

Die Freisetzung der Flavonglykoside, die photometrisch bestimmt wurde, verlief in allen Präparaten parallel zur Freisetzung der Terpenlaktone, die durch HPLC ermittelt wurde. Die Absolutwerte der Freisetzung von Flavonglykosiden und Terpenlaktone unterschieden sich meistens nur um  $\pm 5\%$ .

Zwei Präparate, die nachfolgend in einer Bioverfügbarkeitsstudie eingesetzt werden sollten, wurden zuvor noch bei einem zweiten pH-Wert (4,5; Acetatpuffer) auf ihr *in vitro*-Freisetzungsverhalten untersucht. In nachfolgender Tabelle (Tab. 20) sind die Freisetzungsraten der beiden untersuchten Produktchargen bei pH = 1 und pH = 4,5 gegenübergestellt.

**Tab. 20:** Freisetzungsraten zweier Produkte bei pH = 1 und pH = 4,5

Hersteller/ Vertreiber	Chr.- Nr.	pH	Zeit min	Ginkgolid A %	Ginkgolid B %	Ginkgolid C %	Bilobalid %	n
Nature´s Way Products	0200102	1	5	29,0 ± 3,4	28,9 ± 3,8	29,8 ± 2,9	30,1 ± 1,2	6
			10	79,3 ± 5,0	77,1 ± 4,2	78,4 ± 5,4	80,9 ± 5,7	
			15	94,6 ± 3,4	94,9 ± 1,9	96,1 ± 3,8	95,1 ± 3,5	
			30	100,9 ± 1,3	99,0 ± 0,6	99,7 ± 0,8	101,2 ± 1,7	
		4,5	15	99,7 ± 1,7	99,5 ± 2,0	98,9 ± 2,1	99,6 ± 1,7	6
Whitehall- Robins Healthcare	461-203	1	30	12,9 ± 1,1	13,2 ± 1,6	13,7 ± 1,1	14,2 ± 2,0	3
			60	25,1 ± 2,5	24,4 ± 0,1	26,4 ± 2,5	26,8 ± 0,0	
		4,5	30	11,5 ± 2,3	4,5 ± 0,3	15,5 ± 2,3	17,8 ± 1,5	3
			60	22,1 ± 2,4	9,3 ± 0,7	26,3 ± 3,4	32,5 ± 2,9	

Die schlechte Freisetzung des Whitehall-Robins Healthcare-Produktes bei pH = 1 verbessert sich bei pH = 4,5 nicht nennenswert.

### 3.2 Vergleich von Dosierungsempfehlungen

Um eine Wirksamkeit *in vivo* erzielen zu können, muß die Dosierung des Arzneistoffes so sein, daß wirksame Konzentrationen erreicht, toxische jedoch vermieden werden. Die Kommission E-Monographie gibt eine Dosierungsrichtlinie vor, die sich aus effektiven Konzentrationen des Extraktes EGb 761 in klinischen Studien herleiten. Laut Monographie sollen 120 - 240 mg nativer Trockenextrakt in zwei bis drei Einzeldosen täglich eingenommen werden.

So wurde als weiteres Kriterium zur Beurteilung der Qualität der Präparate die Dosierungsempfehlungen laut Verpackung mit der Empfehlung durch die Kommission E in der Ginkgo-Extrakt-Monographie verglichen. Geht man von einer mit EGb 761 vergleichbaren Extraktqualität aus, so sollten alle Präparate folglich die vorgeschriebene Mindestdosierung von 120 mg Ginkgo-Trockenextrakt pro Tag erfüllen, um überhaupt effektive Wirkstoffspiegel erreichen zu können.

Viele der hier untersuchten amerikanischen Präparate erfüllen diese Anforderung der Monographie E. Andererseits gibt es auch Präparate, die nicht einmal die Untergrenze von 120 mg Extrakt täglich erfüllen oder deren Extraktgehalt einfach nicht festzustellen ist, da zum Beispiel nur eine Angabe wie der bei Präparat Nr. 20 (60 mg Extrakt + 375 mg Blätter)

oder bei Nr. 22 (400 mg pulverisierte Blätter) in der Tabelle 8 deklariert sind. Geht man von einem DEV von 50:1 aus, so kann man eine Größenvorstellung von der empfohlenen Dosierung erhalten (in Tab. 21 in Klammern stehende Zahlen).

**Tab. 21:** Dosierungsempfehlungen laut Umverpackung der US-amerikanischen Ginkgo-Präparate

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Präparatename	Extraktmenge pro Arzneiform [mg]	Einnahme-Empfehlung pro Tag	Tagesdosis [mg Extrakt]
1	Albertsons	Ginkgo Biloba	40	3	120
2	Bayer	One a day Memory & Concentration	60	1-2	60-120
3	Celestial Seasonings	Ginkgo Biloba	60	2	120
4	Dayton Hudson Corporation	Target Ginkgo Biloba	40	3	120
5	Fields of Nature	Ginkgo Biloba	40	1-2	40-80
6	General Nutrition Corporation	Natural Brand Ginkgo Biloba	50	1-...	50-...
7	Health Care Naturals	Ginkgo Extract	40	3	120
8	Leiner Health Products	Your Life Ginkgo Biloba	60	3	180
9	Nature Made Nutritional Products	Ginkgo Biloba	40	3	120
10	Nature's Bounty	Ginkgo Biloba	30	3-4	90-120
11	Nature's Resource Products	Nature's Resource Ginkgo Biloba	40	3	120
12	Nature's Way Products	Ginkgold	60	2	120
13	NaturPharma	Spring Valley Ginkgo Biloba	40	3	120
14	NaturPharma	Spring Valley Ginkgo Extract	40	3	120
15	Now Foods	Now Ginkgo Biloba	60 + 300mg Bl.	1-2	(66-132)
16	Pharmanex	BioGinkgo 24/6	60	2	120
17	Pharmanex	BioGinkgo Extra Strength 27/7	60	2	120
18	Pharmaton	Ginkoba	40	3	120
19	Rite Aid	Ginkgo Biloba	40	3	120
20	Solgar Laboratories	Super Ginkgo	60 + 375mg Bl.	1-2	(67,5-135)
21	Sundown Vitamins	Sundown Herbals Ginkgo Biloba	40	3	120

Nr.	Hersteller/Vertreiber	Präparatename	Extraktmenge pro Arzneiform [mg]	Einnahme-Empfehlung pro Tag	Tagesdosis [mg Extrakt]
22	Sundown Vitamins	Sundown Herbals Ginkgo Biloba (Whole Herb)	400mg Bl.pulv.	...-3	(...24)
23	Trader Joe´s	Trader Darwin´s Ginkgo Biloba	60	2	120
24	Walgreens	Ginkgo-Memo	40	3	120
25	Warner-Lambert	Quanterra	60	2-4	120-240
26	Whitehall-Robins Healthcare	Centrum Herbals Ginkgo Biloba	60	2	120
27	Whole Foods Market	Ginkgo Biloba	60	2-4	120-240
28	Whole Foods Market	Ginkgo Biloba 27/7	40	...-3	...-120

### 3.3 *In vitro*-Versuche an verschiedenen Zellkultursystemen

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, ein *in vitro*-Modell zu finden, welches sich potentiell als pharmakodynamischer Ansatz eignet: folglich auf Ginkgo biloba-Extrakt bzw. einige seiner relevanten Inhaltsstoffe spezifisch anspricht und eine Quantifizierung der Effekte erlaubt.

Ausgangspunkt war eine *ex vivo*-Studie von Schindowski et al. (Schindowski *et al.*, 2001), die zeigt, daß eine Behandlung von Mäusen (100 mg/kg KG p.o. zwei Wochen lang) T-Lymphozyten aus der Milz vor D-Ribose-induzierter Apoptose zu schützen vermag (insbesondere T-Zellen von älteren Mäusen). Auch anderen Arbeiten beschreiben antiapoptotische Eigenschaften des Ginkgo biloba-Extraktes EGb 761 (s. Einleitung).

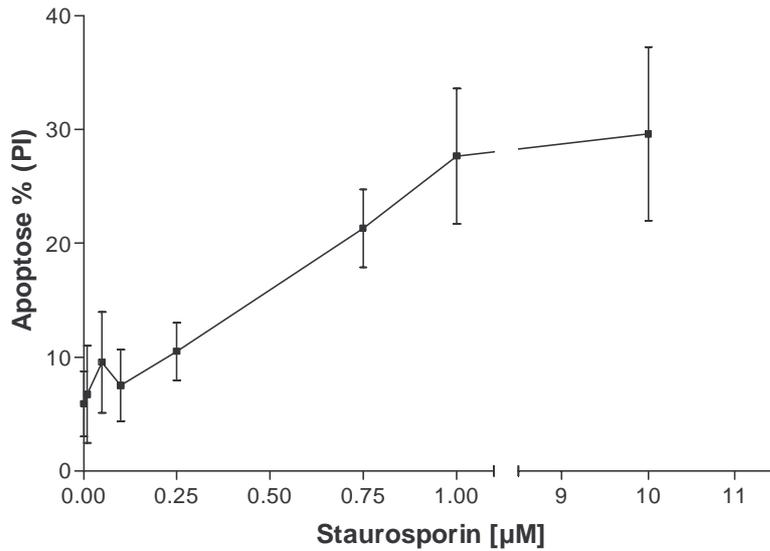
Aufgrund der relativ geringen Effekte von Ginkgo biloba an Maus-Lymphozyten war nicht zu erwarten, daß sich daraus ein Modell entwickeln ließe, welches empfindlich genug ist, auch kleine Unterschiede in Extraktgehalten abzubilden. Ziel war es deshalb, ein Modell zu finden, welches sensitiver auf Apoptosestimuli und -protektiva reagiert.

#### 3.3.1 Apoptose-Versuche an Jurkat-Zellen

Für den ersten Ansatz sollten Jurkat-Zellen verwendet werden, da diese wegen der möglichen Übertragbarkeit dieses *in vitro*-Modells auf *in vivo*-Bedingungen am Menschen als humane tumoröse T-Zelllinie sehr geeignet erscheinen.

##### 3.3.1.1 Untersuchung antiapoptotischer Effekte von Ginkgo biloba nach Koinkubation mit Staurosporin

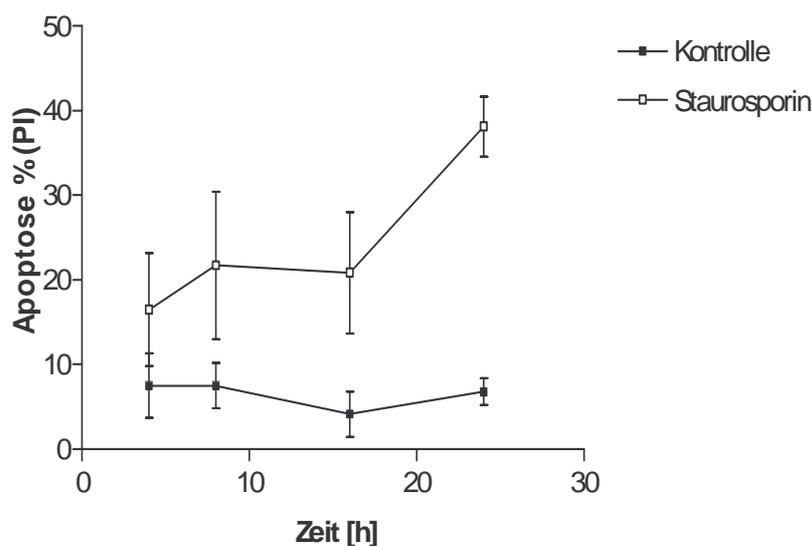
Als spezifisch Apoptose detektierende Methode diente die Propidiumiodid-Färbung, mit welcher die Zellen schnell und in sehr großer Zahl im FACS gemessen werden können. Zur Induktion von Apoptose wurde Staurosporin verwendet, welches in den folgenden Experimenten mit den jeweiligen zu testenden Substanzen für 24 Stunden koinkubiert wurde. Im Rahmen der Methodenetablierung wurde zuerst eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Apoptoserate von der eingesetzten Staurosporinkonzentration festgestellt. Abb. 27 zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit von Staurosporin nach 24 Stunden Inkubation (n = 3 - 7).



**Abb. 27:** Konzentrationsabhängigkeit des apoptotischen Effektes von Staurosporin nach PI-Färbung an Jurkat-Zellen, Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 3 - 7, jeweils als Dreifachbestimmung)

Bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  steigt die Apoptoserate kontinuierlich an, danach scheint sie in eine Plateauphase überzugehen: 10  $\mu\text{M}$  Staurosporin konnte die Apoptoserate gegenüber 1  $\mu\text{M}$  nur von etwa 28 % auf 30 % steigern. Dieses Phänomen könnte darauf beruhen, daß die Zelltoxizität zwar weiter ansteigt, bei gleichbleibender Apoptoserate aber in Richtung Nekrose verschoben ist, welche in der PI-Färbung nicht erfaßt wird.

Abb. 28 zeigt die Zeitabhängigkeit der durch 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin induzierten Apoptoserate. Die nach 24 Stunden induzierte Apoptose ist gegenüber der basalen Apoptose deutlich erhöht, so daß die Detektion von Unterschieden nach dieser Zeitspanne ausreichend gut möglich sein müßte.



**Abb. 28:** Zeitabhängigkeit des apoptotischen Effektes von Staurosporin [1  $\mu$ M] nach PI-Färbung an Jurkat-Zellen, Mittelwert  $\pm$  SD, n = 2, jeweils Dreifachbestimmung

Über eine Kontrollfärbung mit 7-AAD konnte für die Bedingungen 24 Stunden und 1  $\mu$ M Staurosporin gezeigt werden, daß spezifisch Apoptose und kaum Nekrose (< 7 %) ausgelöst wird (Daten nicht gezeigt).

Es wurden verschiedene Konzentrationen EGb 761, diverser Inhaltsstoffe (Ginkgolid B, Bilobalid und Quercetindihydrat) und spezielle EGb 761-Fractionen (Nr. 1, 5 und 7) untersucht.

Fraktion 1 wurde rein wäßrig extrahiert und enthielt weder nachweisbare Mengen Flavonglykoside noch Terpenlaktone. Fraktion 5 wurde durch Elution mit 40 % Ethanol gewonnen und enthielt 9 % Terpenlaktone und auch Flavonglykoside. Fraktion 7 wurde mit 96%igem Ethanol extrahiert und enthielt weder Terpenlaktone noch Flavonglykoside. Die drei verschiedenen Extraktfraktionen sollten das Spektrum der Eigenschaften des EGb 761 je nach Anreicherung der sehr hydrophilen bis zu sehr lipophilen Komponenten widerspiegeln.

Für alle getesteten Substanzen wurde überprüft, ob sie einen Effekt auf die durch PI detektierbare basale Apoptoserate haben. Die mittlere basale Apoptoserate für alle mit Jurkat-Zellen durchgeführten Experimente lag bei 3 – 5 %. Durch Inkubation mit 1  $\mu$ M Staurosporin für 24 Stunden konnten Apoptoseraten von durchschnittlich 38 – 43 % induziert werden. Die Abweichung der Apoptoserate von der in der Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 27)

ermittelten, hängt vermutlich mit der Verwendung einer anderen Charge Staurosporin zusammen. Diese Differenzen haben für die Auswertung der Experimente keine Bedeutung, da in den vergleichenden Untersuchungen nachfolgend immer die gleiche Charge verwendet wurde.

#### *Ginkgo biloba-Extrakt EGb 761*

EGb 761 zeigte im Konzentrationsbereich von 10 – 500 µg/ml keine Beeinflussung der basalen Apoptoserate. Die höchste eingesetzte Konzentration an Lösungsmittel DMSO 0,3 % hatte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Protektive Effekte durch Ginkgo biloba-Extrakt konnten im Konzentrationsbereich von 50 – 500 µg/ml nach Koinkubation mit Staurosporin für 24 Stunden nicht nachgewiesen werden (n = 4 - 6, Daten nicht gezeigt).

#### *Ginkgolid B*

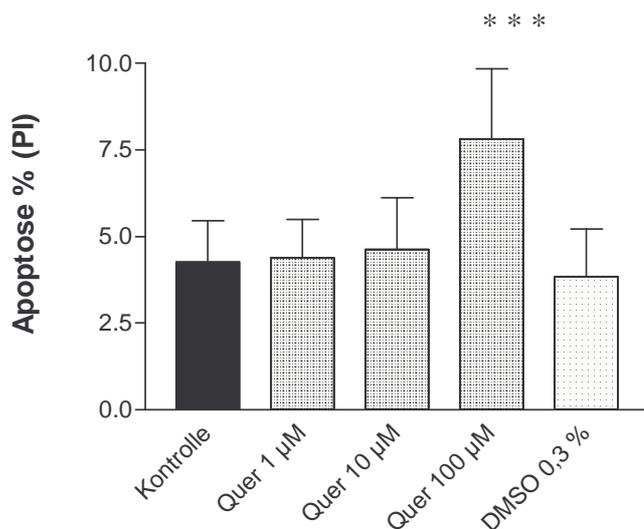
Ginkgolid B beeinflusste im Konzentrationsbereich von 1 µM – 100 µM die basale Apoptoserate (n = 5 - 6, Daten nicht gezeigt) nicht. Auch für Ginkgolid B (1 – 500 µM) konnten nach Koinkubation mit 1 µM Staurosporin für 24 Stunden keine Apoptose-protectiven Effekte nachgewiesen werden (n = 4, Daten nicht gezeigt).

#### *Bilobalid*

Bilobalid zeigte in Konzentrationsbereichen von 1 – 500 µM keinen Effekt auf die basale Apoptoserate (n = 4, Daten nicht gezeigt). Apoptose-protective Effekte konnten für keine Konzentration von 1 – 500 µM nachgewiesen werden (n = 4, Daten nicht gezeigt).

#### *Quercetindihydrat*

Quercetindihydrat erhöhte in einer Konzentration von 100 µM die basale Apoptoserate signifikant ( $p < 0,001$ ) von etwa 4 % auf 8 % (s. Abb. 29). Diese Konzentration ist extrem hoch; der proapoptotische Effekt dieser Konzentration dürfte daher physiologisch irrelevant sein. Protektive Effekte konnten nach Koinkubation mit Staurosporin nicht gezeigt werden (n = 4, Daten nicht gezeigt).

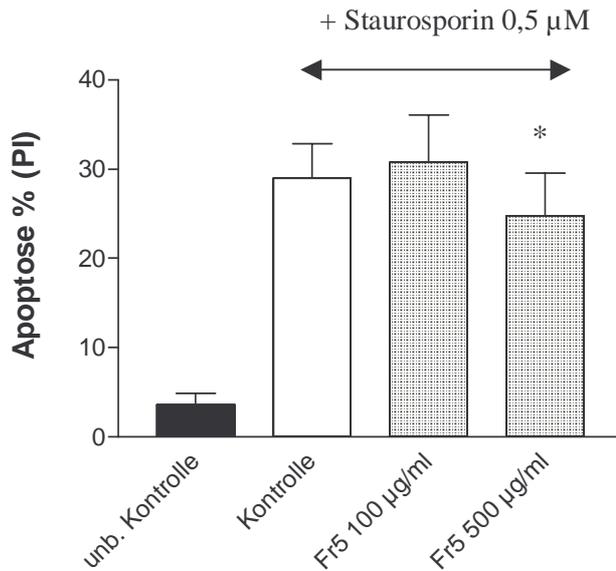


**Abb. 29:** Einfluß verschiedener Konzentrationen Quercetindihydrat auf die basale Apoptoserate an Jurkat-Zellen; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 4), ANOVA: \*\*\* p < 0,001 Quer 100  $\mu$ M vs. Kontrolle

#### Fraktion 5

Fraktion 5 ist eine Terpenlaktone-reiche Extraktfraktion (9 % bezogen auf Extrakt; s. 2.1.2.3). Sie zeigte in einer Konzentration von 100 – 500  $\mu$ g/ml keinen Einfluß auf die basale Apoptoserate (n = 5, Daten nicht gezeigt).

Einen Apoptose-protektiven Effekt zeigte die Koinkubation mit Fraktion 5 in einer Konzentration von 500  $\mu$ g/ml. Die durch Staurosporin 1  $\mu$ M (24 Stunden) ausgelöste Apoptoserate von 29 % konnte signifikant auf 25 % gesenkt werden (s. Abb. 30). Dieser scheinbar protektive Effekt beruht höchstwahrscheinlich auf einer Verschiebung von Apoptose in Richtung Nekrose, welche mit der PI-Färbung nicht detektiert wird (s. Abschnitt 3.3.2.2).



**Abb. 30:** Einfluß verschiedener Konzentrationen Fr 5 auf die Staurosporin induzierte Apoptoserate an Jurkat-Zellen; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 6), ANOVA: \* p < 0,05 Fr 5 500 µg/ml vs. Staurosporin-behandelter Kontrolle

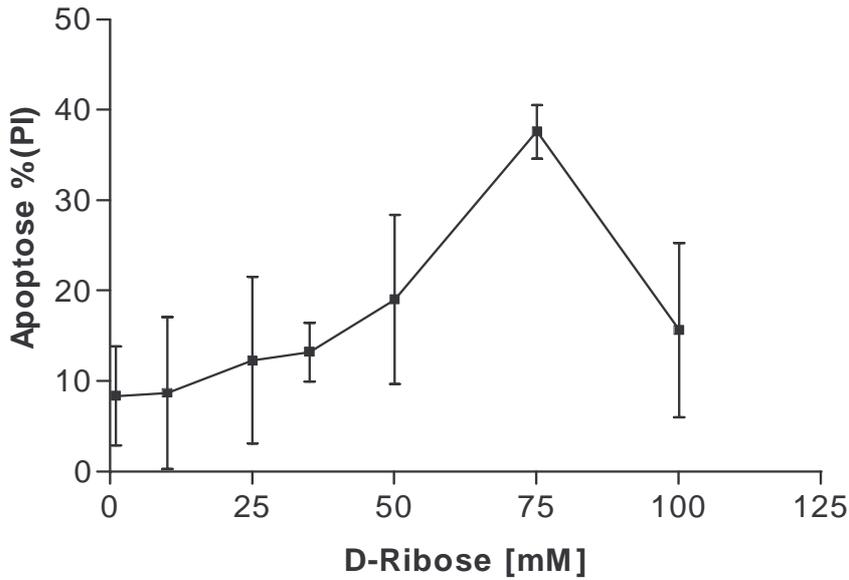
*Fazit*

Mit diesem Modell unter den genannten Bedingungen konnten durch EGb 761 oder einen seiner getesteten Inhaltsstoffe keine protektiven Effekte gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose beobachtet werden.

3.3.1.2 Untersuchung antiapoptotischer Effekte von Ginkgo biloba an Jurkat-Zellen nach Koinkubation mit Desoxy-D-Ribose

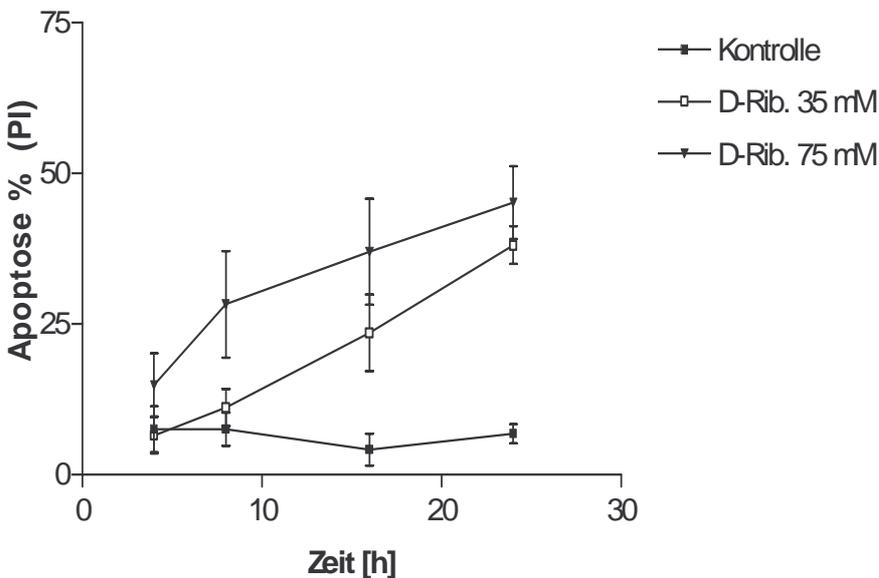
Des weiteren wurde untersucht, ob Ginkgo biloba oder einzelne Inhaltsstoffe des Extraktes nach Induktion mit einem anderen Apoptose auslösenden Agens protektiv wirken können. Zur Apoptose spezifischen Detektion diente die Propidium-Iodid-Färbung.

Abb. 31 zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit der Apoptoserate nach 24 Stunden von der Konzentration der eingesetzten Desoxy-D-Ribose. Auffällig sind die extrem großen Schwankungen bezüglich der ausgelösten Apoptose. Die starke Abnahme der Apoptoserate von der D-Ribose-Konzentration 75 mM gegenüber 100 mM beruht wahrscheinlich darauf, daß die Zellen bei dieser hohen Konzentration vermehrt in Nekrose übergehen und damit aus dem apoptotischen Fenster verschwinden, die durch PI-gemessene Rate folglich abnimmt.



**Abb. 31:** Konzentrationsabhängigkeit der ausgelösten Apoptoserate von der Desoxy-D-Ribose an Jurkat-Zellen; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3 - 7; jeweils Dreifachbestimmung)

Für die zwei D-Ribose-Konzentrationen mit den geringsten Schwankungen, 35 und 75 mM, wurde eine Zeitabhängigkeit durchgeführt (s. Abb. 32). Gleichzeitig waren das die Konzentrationen, die eine mittlere bzw. die maximale Apoptoserate auszulösen vermochten.

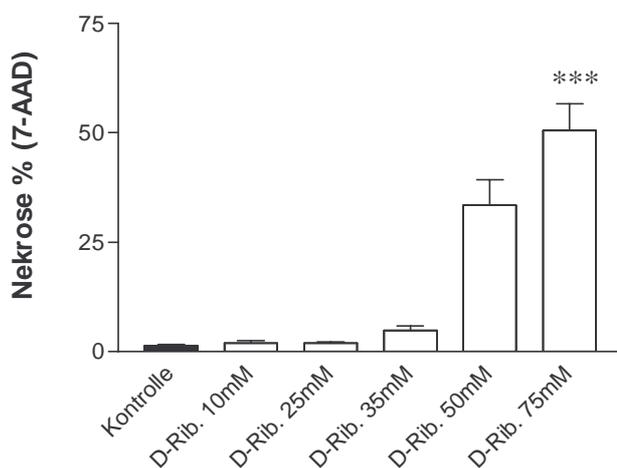


**Abb. 32:** Zeitabhängigkeit der ausgelösten Apoptoserate durch 35 od. 75 mM Desoxy-D-Ribose an Jurkat-Zellen; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 2; jeweils Dreifachbestimmung)

Sowohl die Konzentration 35 mM als auch 75 mM zeigten gegenüber der basalen Apoptoserate eine deutliche Steigerung, so daß beide Konzentrationen nach 24 Stunden geeignet sein müßten, eventuell protektive Effekte abzubilden. Da in diesen Experimenten gezielt die Apoptose-protaktiven Effekte des Ginkgo biloba untersucht werden sollte, wurden die beiden Konzentrationen D-Ribose durch 7-AAD-Färbung auf die Auslösung von Nekrose neben der Auslösung von Apoptose getestet.

Es sollte die Konzentration an D-Ribose herausgefunden werden, die spezifisch Apoptose auszulösen vermag. Abb. 33 zeigt die durch 7-AAD-Färbung ausgelöste Rate an Nekrose u.a. für die beiden Konzentrationen D-Ribose 35 mM und 75 mM nach 24 Stunden Inkubation. 75 mM D-Ribose zeigte eine signifikante Auslösung an Nekrose von etwa 50 % der gesamten Zellen. 35 mM D-Ribose wies keine signifikante Zunahme der Nekroserate im Vergleich zur Kontrolle auf.

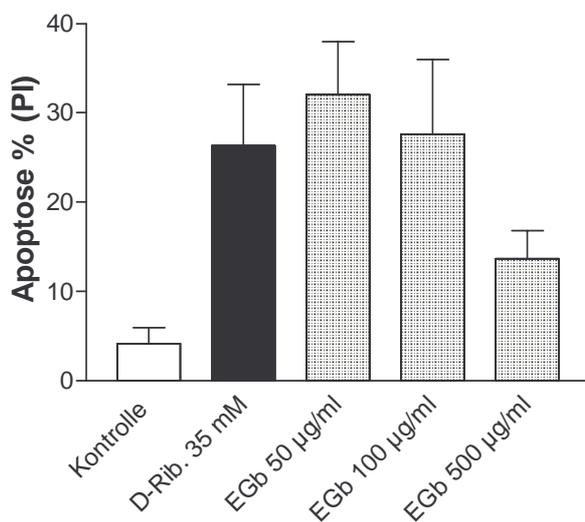
Im folgenden wurden die Experimente mit einer Konzentration von 35 mM D-Ribose bei 24 Stunden Inkubation durchgeführt. Anzumerken ist, daß auch die durch 35 mM D-Ribose ausgelösten Apoptoseraten über die verschiedenen Versuchstage gesehen Schwankungen im Bereich von 18 % bis 29 % unterlagen.



**Abb. 33:** Ausgelöste Nekrose nach 7-AAD-Färbung durch 35 mM od. 75 mM Desoxy-D-Ribose an Jurkat-Zellen; Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3; jeweils Dreifachbestimmung); ANOVA: \*\*\* p < 0,001 D-Rib. 50 mM u. 75 mM vs. Kontrolle

*Ginkgo biloba-Extrakt EGb 761*

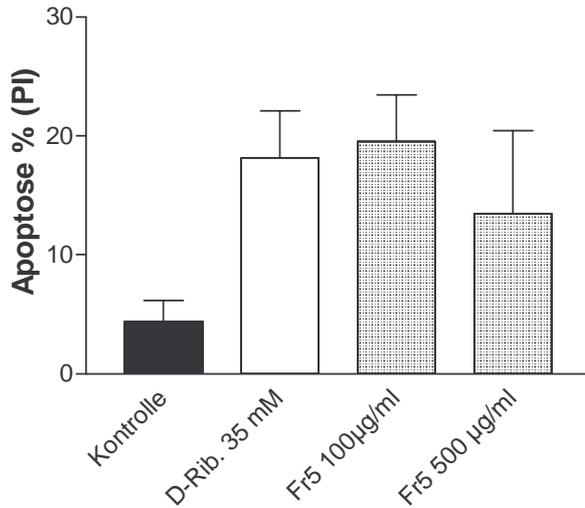
Ginkgo biloba in Konzentrationen von 500 µg/ml zeigte protektive Effekte nach Koinkubation mit 35 mM D-Ribose für 24 Stunden. Die durch D-Ribose von 5 % auf 26 % erhöhte Apoptoserate konnte auf etwa 14 % für 500 µg/ml EGb 761 gesenkt werden (s. Abb. 34).



**Abb. 34:** Einfluß verschiedener Konzentrationen EGb 761 auf die D-Ribose 35 mM-induzierte Apoptoserate an Jurkat-Zellen; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 4 - 7), ANOVA: \*\*\* p < 0,001 EGb 500 µg/ml vs. D-Ribose

*Fraktion 5*

Die Fraktion 5 zeigte protektive Effekte bei Konzentrationen von 500 µg/ml nach Koinkubation mit 35 mM D-Ribose für 24 Stunden. Die durch D-Ribose von 5 % auf 18 % erhöhte Apoptoserate konnte in ähnlicher Größenordnung wie durch EGb 761 auf ca. 14 % für 500 µg/ml FR 5 gemindert werden (s. Abb. 35).



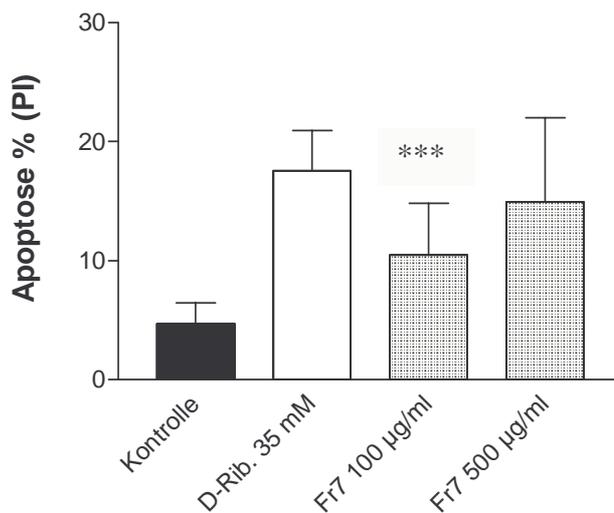
**Abb. 35:** Einfluß verschiedener Konzentrationen der Fraktion 5 auf die D-Ribose-induzierte Apoptoserate an Jurkat-Zellen; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 9), ANOVA: \*\* p < 0,01 Fr 5 500 µg/ml vs. D-Ribose

*Fraktion 1*

Fraktion 1 zeigt nach Koinkubation mit D-Ribose keine Apoptose-protectiven Eigenschaften.

*Fraktion 7*

Fraktion 7 zeigte in einer Konzentrationen von 100 µg/ml antiapoptotische Eigenschaften nach Koinkubation mit D-Ribose für 24 Stunden (s. Abb. 36).



**Abb. 36:** Einfluß verschiedener Konzentrationen der Fraktion 7 auf die D-Ribose-induzierte Apoptoserate an Jurkat-Zellen; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 5), ANOVA: \*\*\* p < 0,001 Fr 7 100 µg/ml vs. D-Ribose

---

*Ginkgolid B, Bilobalid und Quercetindihydrat*

Weder Ginkgolid B (1 – 250  $\mu\text{M}$ ), Bilobalid (1 – 500  $\mu\text{M}$ ) noch Quercetindihydrat (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) zeigten protektive Eigenschaften (Daten nicht gezeigt).

*Fazit*

Nur durch extrem hohe Konzentration EGb 761 (500  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. Fraktion 5 (500  $\mu\text{g/ml}$ ) konnten gegenüber D-Ribose ausgelöster Apoptose eine Protektion bewirkt werden. Ginkgolid B, Bilobalid und Quercetindihydrat zeigten keinerlei protektive Effekte. Fraktion 7 zeigte in einer Konzentration 100  $\mu\text{g/ml}$  einen schwach protektiven Effekt, der sich allerdings bei höherer Konzentration nicht mehr zeigte.

So erscheint auch dieses Modell an Jurkat-Zellen mit Apoptose-Auslösung durch Desoxy-D-Ribose nicht sensitiv genug und ungeeignet als pharmakodynamischer Ansatz für einen Bioassay zu sein.

### 3.3.2 Apoptose-Versuche an menschlichen Lymphozyten (PBMC)

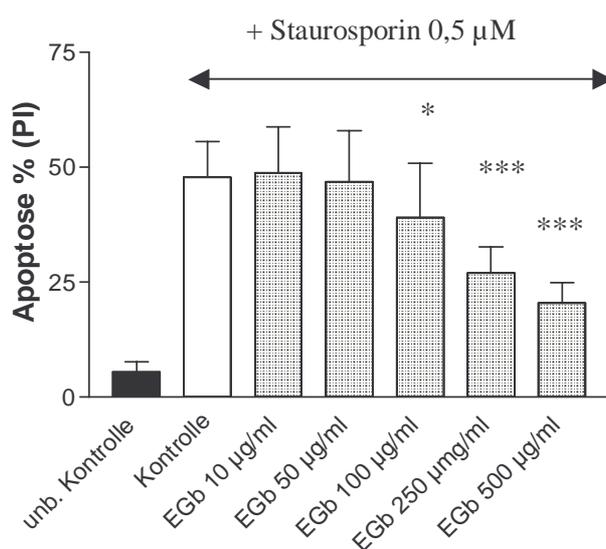
Für einen weiteren Ansatz wurden menschliche Lymphozyten (PBMC) verwendet, die möglicherweise aufgrund anderer Eigenschaften als Jurkat-Zellen, welche tumorösen Ursprungs sind, sensitiver reagieren könnten.

#### 3.3.2.1 Untersuchung antiapoptotischer Effekte von Ginkgo biloba nach Koinkubation mit Staurosporin

Auch hier wurde mit Hilfe des Propidium-Iodid-Assays untersucht, ob verschiedene EGb 761-Konzentrationen oder Einzelsubstanzen des Extraktes die durch Staurosporin induzierte Apoptose zu hemmen vermögen. Des weiteren wurde untersucht, ob Effekte auf die basale Apoptose zu detektieren sind. Die Versuche liefen über 24 Stunden; Protektor und Induktor wurden koinkubiert. Je Versuchstag wurden mindestens Doppelbestimmungen vorgenommen.

#### EGb 761

Ginkgo biloba-Extrakt in Konzentrationen von 10 – 500  $\mu\text{g/ml}$  zeigte keinen Effekt auf die basale Apoptoserate (Daten nicht gezeigt). Nach Apoptose-Induktion mit 0,5  $\mu\text{M}$  Staurosporin konnte das Ansteigen der Apoptoserate auf 48 % durch EGb 761 konzentrationsabhängig maximal auf 20 % gehemmt werden (s. Abb. 37).



**Abb. 37:** Einfluß verschiedener Konzentrationen EGb 761 auf die Staurosporin-induzierte Apoptose an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 6), ANOVA: \*\*\* p < 0,001 EGb 250  $\mu\text{g/ml}$  u. 500  $\mu\text{g/ml}$ , \* p < 0,05 EGb 100  $\mu\text{g/ml}$  vs. Staurosporin-behandelter Kontrolle

*Bilobalid*

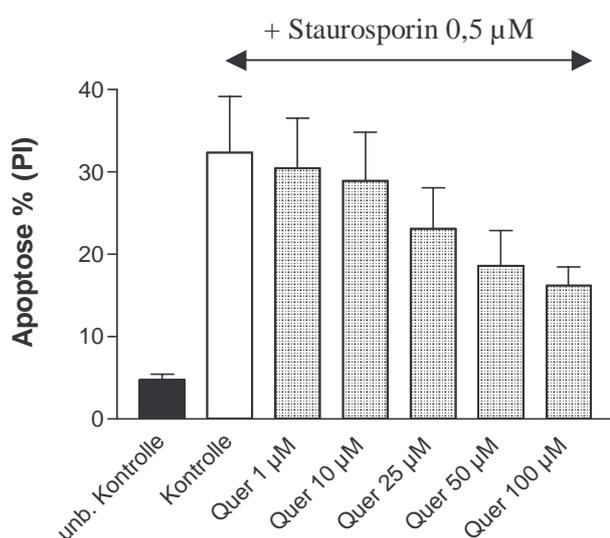
Verschiedene Konzentrationen Bilobalid 1 – 500  $\mu\text{M}$  sowie die maximal eingesetzte Konzentration an dem Lösungsmittel DMSO 0,5 % hatten keinen Einfluß auf die basale Apoptoserate (Daten nicht gezeigt). Bezüglich der Staurosporin induzierten Apoptose zeigte Bilobalid im Konzentrationsbereich 1 – 500  $\mu\text{M}$  keine protektiven Effekte (Daten nicht gezeigt).

*Kämpferol*

Kämpferol hat nur in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  die Apoptoserate von basal 5 % signifikant ( $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ) auf 7 % erhöht (Daten nicht gezeigt). Protektive Effekte gegenüber Staurosporin induzierter Apoptose konnten nicht festgestellt werden; im Gegenteil eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erhöhte sogar die Apoptoserate noch signifikant ( $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ) von 32 % auf 44 %.

*Quercetindihydrat*

In Konzentrationen von 1 – 100  $\mu\text{M}$  verändert Quercetindihydrat nicht die basale Apoptoserate (Daten nicht gezeigt). Allerdings hemmt es konzentrationsabhängig die durch Staurosporin induzierte Apoptoserate von 32 % auf 16 % minimal (s. Abb. 38).



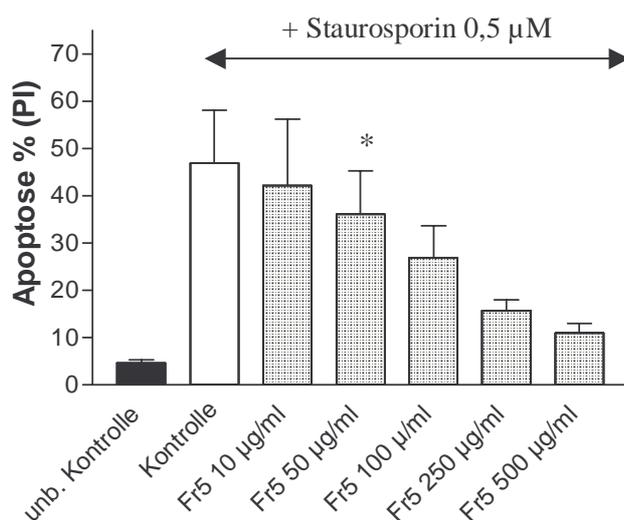
**Abb. 38:** Einfluß verschiedener Konzentrationen Quercetindihydrat auf die Staurosporin-induzierte Apoptoserate an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 4-8$ ), ANOVA: \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Staurosporin-behandelter Kontrolle

*Ginkgolid B*

Ginkgolid B zeigt in einer Konzentration von 10 µM eine signifikante ( $p < 0,01$ ;  $n = 6$ ) Abnahme der basalen Apoptoserate (Daten nicht gezeigt) von 5 % auf 3 %. Protektive Effekte lassen sich für Ginkgolid B nicht zeigen, 500 µM erhöhen sogar die Apoptoserate signifikant ( $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ) (Daten nicht gezeigt).

*Fraktion 5*

Ginkgo biloba-Extrakt-Fraktion 5 verändert die basale Apoptoserate in den eingesetzten Konzentrationen von 10 – 500 µg/ml nicht (Daten nicht gezeigt). Bei der durch Staurosporin induzierten Apoptose zeigen sich konzentrationsabhängige Effekte durch Koinkubation mit Fraktion 5. Dabei läßt sich die induzierte Apoptoserate von 47 % auf minimal 11 % hemmen (s. Abb. 39).



**Abb. 39:** Einfluß verschiedener Konzentrationen Extrakt-Fraktion 5 auf Staurosporin (0,5µM)-induzierte Apoptoserate an PBMC; Mittelwerte ± SD ( $n = 2 - 6$ ); ANOVA: \*\*\*  $p < 0,001$  Fr 5 100, 250 und 500 µg/ml und \*  $p < 0,05$  EGb 50 µg/ml vs. Staurosporin-behandelter Kontrolle

3.3.2.2 Überprüfung der PI-Ergebnisse mit 7-AAD-Assay

Um abzuklären, ob die im PI-Assay beobachteten protektiven Effekte der einzelnen Substanzen wirklich auf Apoptose-protective Eigenschaften zurückzuführen sind, wurden die entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Substanzen im 7-AAD-Assay überprüft.

Denkbar wäre, daß Abnahmen der Apoptoseraten mit der Propidium-Iodid-Methode, die spezifisch nur Apoptose und keine Nekrose detektiert, in der Realität nur Verschiebungen zur

---

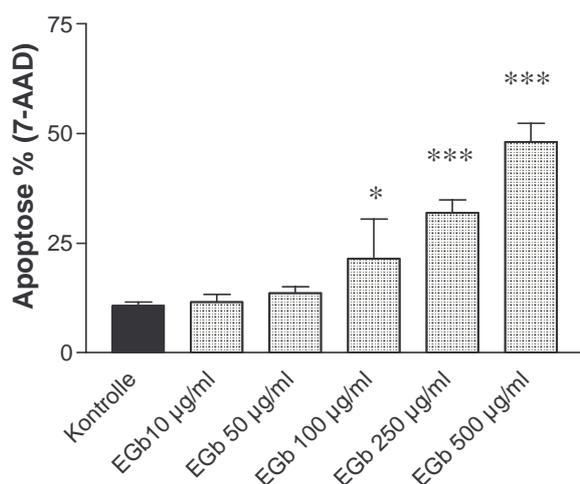
Nekrose darstellen. So bedeuteten die Apoptose-protectiven Effekte im PI-Assay keinen Schutz vor Zelltod, sondern nur eine Verschiebung der Verhältnisse Apoptose / Nekrose.

Im folgenden werden die Befunde aus dem 7-AAD-Assay beschrieben, wobei mit diesem Farbstoff zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden kann. Daß die mit dem PI-Farbstoff detektierten Apoptoseraten nicht mit denen durch 7-AAD errechneten Apoptoseraten übereinstimmen, hat u.a. den Grund, daß bei der 7-AAD-Messung zwischen Subpopulationen des PBMC unterschieden wurde (Monozyten wurden elektronisch markiert und von der Messung ausgeschlossen) und bei der PI-Messung nicht. Des weiteren ist es möglich, daß die beiden Methoden evtl. verschiedene Stadien der Apoptose erfassen oder aufgrund der Aufbereitung vor der Messung DNA-Bruchstücke bei der PI-Färbung aufgrund von Waschschrinen verlorengehen und bei der 7-AAD-Färbung nicht.

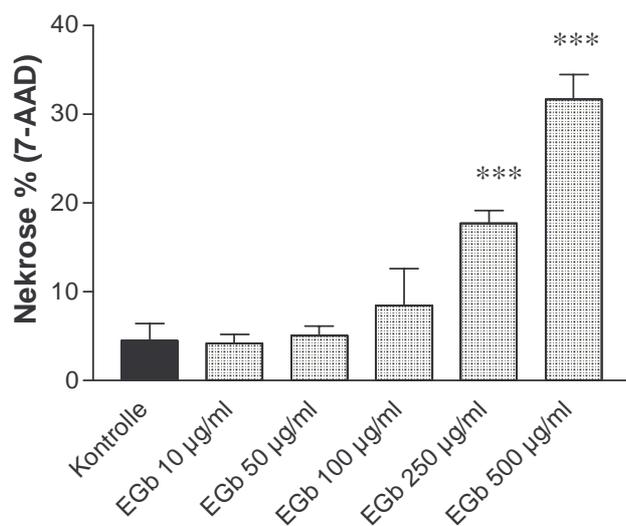
Folglich können die Ergebnisse innerhalb derselben Methode miteinander verglichen werden, nicht jedoch die ermittelten Apoptoseraten der PI-Messung mit denen der 7-AAD-Messung. Allerdings lassen die Ergebnisse der einen Methode Interpretationen qualitativer Art auf die andere Methode zu.

#### *EGB 761*

Die Messung der in der PI-Messung verwendeten Konzentrationen an EGB 761 ergibt die in Abbildung 40 und 41 gezeigten Apoptose- und Nekrosraten.



**Abb. 40:** Einfluß verschiedener Konzentrationen EGb 761 auf die basale Apoptoserate an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 4); ANOVA: \*\*\* p < 0,001 EGb 250 u. 500  $\mu$ g/ml und \* p < 0,05 EGb 100  $\mu$ g/ml vs. Kontrolle



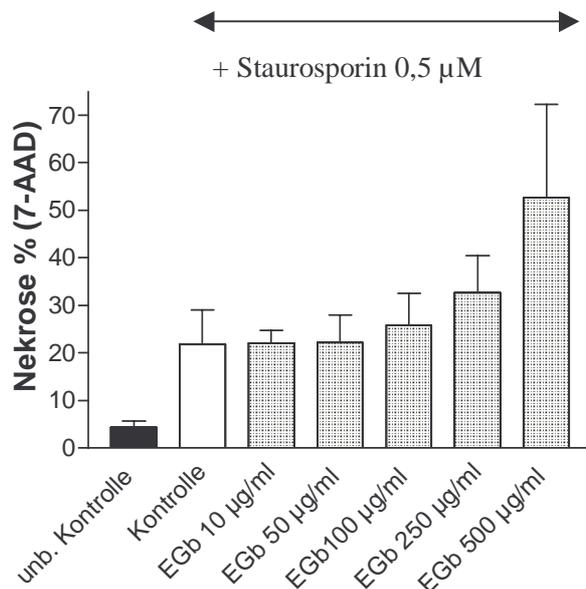
**Abb. 41:** Einfluß verschiedener Konzentrationen EGb 761 auf die basale Nekroserate an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 4); ANOVA: \*\*\* p < 0,001 EGb 250 u. 500  $\mu$ g/ml vs. Kontrolle

Die höchste verwendete Konzentration an Lösungsmittel DMSO ergab keinen Effekt auf Nekrose- oder Apptoseraten.

Abb. 41 zeigt deutlich, daß die im PI-Assay Apoptose protektiv wirkenden Konzentrationen an EGb 761 eine signifikante Erhöhung der Nekroserate gegenüber der Kontrolle auszulösen

vermögen. Das macht die Hypothese wahrscheinlich, daß diese Konzentrationen nicht zellschützend wirken, also auch nicht wirklich Apoptose-protektiv sind.

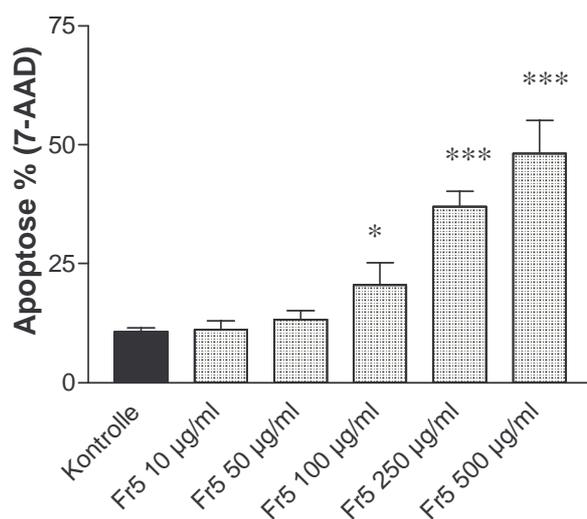
Betrachtet man die nach Koinkubation mit Staurosporin für 24 Stunden durch den 7-AAD-Assay gemessenen Apoptose- und Nekroseraten, so zeigen sich hier keine antiapoptotischen Eigenschaften des EGb 761 ( $n = 4$ , Daten nicht gezeigt). Im Gegenteil, eine Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  zeigt zusätzlich zur durch Staurosporin ausgelösten Nekroserate zelltoxische Eigenschaften (s. Abb. 42).



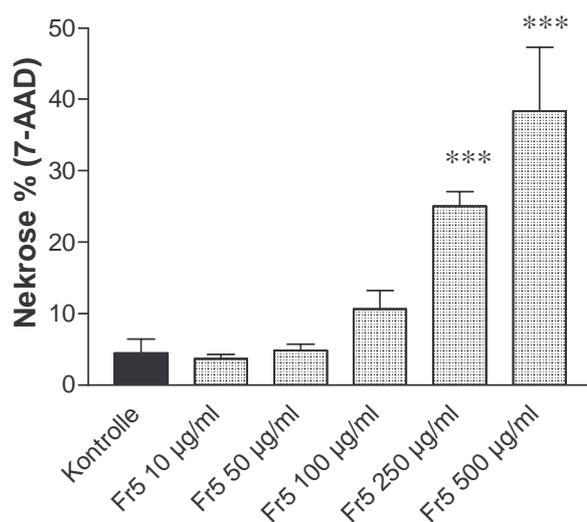
**Abb. 42:** Einfluß verschiedener Konzentrationen EGb 761 auf die Staurosporin-induzierte Nekroserate an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 4$ ); ANOVA: \*\*\*  $p < 0,001$  EGb 500  $\mu\text{g/ml}$  vs. Staurosporin-behandelter Kontrolle

*Fraktion 5*

Auf die gleiche Weise wurden die im PI-Assay Apoptose-protectiv erscheinenden Konzentrationen an Fraktion 5 überprüft. Auch hier hatte die höchste verwendete Konzentration des Lösungsmittels EtOH keinen Einfluß auf die Apoptose- oder Nekroseraten. Abb. 43 und 44 zeigen, daß die höheren Konzentrationen an Fraktion 5 apoptotisch und nekrotisch wirken.



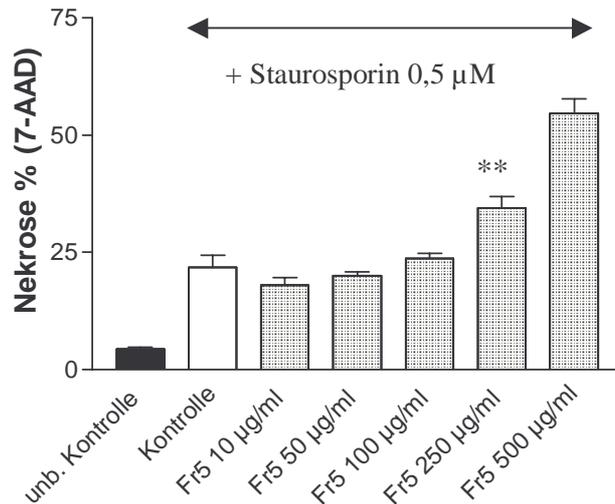
**Abb. 43:** Einfluß verschiedener Konzentrationen Fr5 auf die basale Apoptoserate an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 2); ANOVA: \*\*\* p < 0,001 Fr 5 250 und 500  $\mu$ g/ml, \* p < 0,05 Fr 5 100  $\mu$ g/ml vs. Kontrolle



**Abb. 44:** Einfluß verschiedener Konzentrationen der Extrakt-Fraktion 5 auf die basale Nekroserate an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 2), ANOVA: \*\*\* p < 0,001 Fr 5 250 und 500  $\mu$ g/ml vs. Kontrolle

Die im PI-Assay Apoptose-protectiven Konzentrationen an Fraktion 5 zeigen in der 7-AAD-Messung keine antiapoptotischen Eigenschaften (Daten nicht gezeigt).

Die Konzentration von 250 und 500 µg/ml Fraktion 5 zeigten hinsichtlich der Nekrose zelltoxische Wirkung (s. Abb. 45).



**Abb. 45:** Einfluß verschiedener Konzentrationen Extrakt-Fraktion 5 auf Staurosporin-induzierte Nekroserate an PBMC; Mittelwerte ± SD (n = 2 - 4), ANOVA: \*\*\* p < 0,001 Fr 5 500 µg/ml vs. Staurosporin und \*\* p < 0,01 Fr 5 250 µg/ml vs. Staurosporin-induzierter Kontrolle

### 3.3.2.3 Überprüfung der Zelltoxizität von Ginkgo biloba und Extrakt-Fraktion 5 durch Trypanblau-Auszählung

Eine weitere Methode, die Zelltoxizität der hohen Ginkgo biloba- bzw. Extraktfraktion 5-Konzentrationen nachzuweisen, ist die Trypanblau-Auszählung im Durchlicht-Mikroskop. Es handelt sich um eine Methode, die sehr späte Ereignisse der Apoptose (nämlich Schädigung der Zellmembran) bzw. Nekrose nachweist.

Auch in diesem Versuchsansatz zeigten die höchsten eingesetzten Lösungsmittelkonzentrationen an DMSO und Ethanol keine Zytotoxizität.

#### *Egb 761*

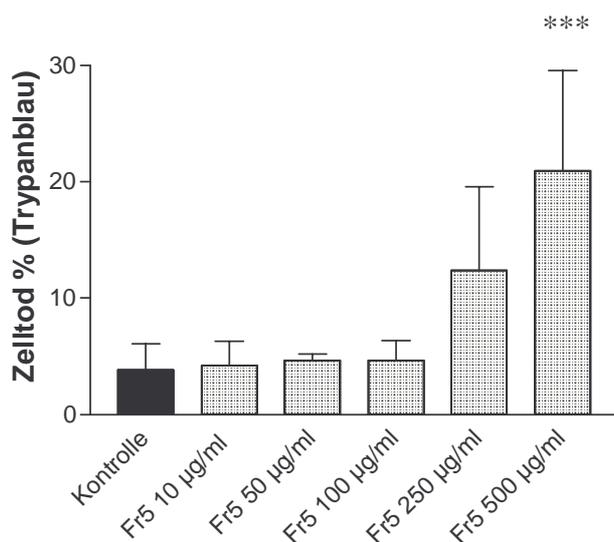
Nach 24 Stunden zeigten die EGb 761-Konzentrationen 100 – 500 µg/ml keine signifikanten Effekte auf den basalen Zelltod. Die Konzentration 500 µg/ml zeigt tendenziell zytotoxische Eigenschaften, die aufgrund der hohen Variabilität nach manueller Auszählung noch nicht signifikant gegenüber Kontrolle waren (n = 1 - 3, je Dreifachbestimmung; Daten nicht

gezeigt). Das gleiche Bild zeigten die Ergebnisse nach 24 Stunden Koinkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  Staurosporin ( $n = 1 - 3$ , jeweils Dreifachbestimmung; Daten nicht gezeigt).

Staurosporin in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  zeigte selbst einen nur sehr geringen Effekt in der Trypanblau-Auszählung, da es in dieser Konzentration und über 24 Stunden an Lymphozyten ein spezifischer Apoptoseinduktor ist. Trypanblau färbt Zellen in einem sehr späten Stadium der Apoptose oder einen geringen Prozentsatz an nekrotischen Zellen, so daß nach 24 Stunden durch Staurosporin nur etwa 10 % Zelltod im Vergleich zu 5 % basal zu detektieren ist.

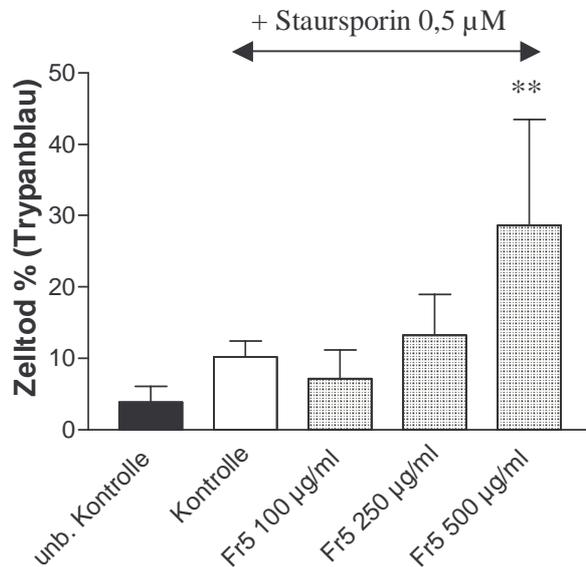
#### Fraktion 5

Fraktion 5 in einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  über 24 Stunden zeigte signifikant zytotoxische Effekte im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 46).



**Abb. 46:** Einfluß verschiedener Konzentrationen der Extrakt-Fraktion 5 auf den basalen Zelltod nach 24 h an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n = 1 - 3$ ); ANOVA: \*\*\*  $p < 0,001$  Fr 5 500  $\mu\text{g/ml}$  vs. Kontrolle

Bei Koinkubation mit Staurosporin 0,5  $\mu\text{M}$  über 24 Stunden konnte kein protektiver Effekt gezeigt werden. Fraktion 5 in einer Konzentration von 500  $\mu\text{g/ml}$  wies zytotoxischere Effekte im Vergleich zu Staurosporin 0,5  $\mu\text{M}$  auf (s. Abb. 47).



**Abb. 47:** Einfluß verschiedener Konzentrationen der Extrakt-Fraktion 5 auf Staurosporin induzierten Zelltod nach 24 h an PBMC; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 1 - 3); ANOVA: \*\* p < 0,01 Fr 5 500  $\mu\text{g/ml}$  vs. Staurosporin-induzierter Kontrolle

#### *Fazit aus den Versuchen mit Lymphozyten (PBMC)*

Die Untersuchung auf antiapoptotische Eigenschaften von Ginkgo biloba-Extrakt oder bestimmten Einzelsubstanzen aus diesem Extrakt hat ergeben, daß quasi keine protektiven Effekte zu verzeichnen waren. Quercetindihydrat zeigte in der PI-Messung protektive Effekte, die aber nicht mehr mit der 7-AAD-Messung oder Trypanblau-Färbung überprüft wurden. Möglicherweise könnte es sich also – wie bei EGb 761 bzw. Fraktion 5 - herausstellen, daß das Phänomen der Apoptoseprotektion nur eine Verschiebung von Apoptose Richtung Nekrose widerspiegelt, die mit PI-Färbung nicht erfaßt wird. Falls die beobachtete Reduktion der Apoptoserate tatsächlich auf zellschützende Eigenschaften des Quercetindihydrates zurückzuführen ist, so scheint dieses Modell dennoch nicht geeignet für einen Bioassay, der verschiedene Extrakte zu quantifizieren erlauben soll, denn EGb 761 als Extrakt zeigte in dieser Versuchsreihe keine protektiven Eigenschaften.

### 3.3.3 MTT-Versuche an PC-12-Zellen

Da Zellsysteme, die aus der Peripherie des Menschen stammen, sich unter den gewählten Bedingungen nicht als ausreichend sensitiv und damit für einen quantifizierbaren Bioassay als geeignet erwiesen, sollten als nächstes potentielle Effekte auf neuronaler Ebene betrachtet werden. Es wurden PC-12 Zellen - als anerkanntes Modell für neuronale Zellen – verwendet, in der Hoffnung, daß diese sensitiver auf bestimmte Agentien und Stimuli reagieren würden als periphere Zellen.

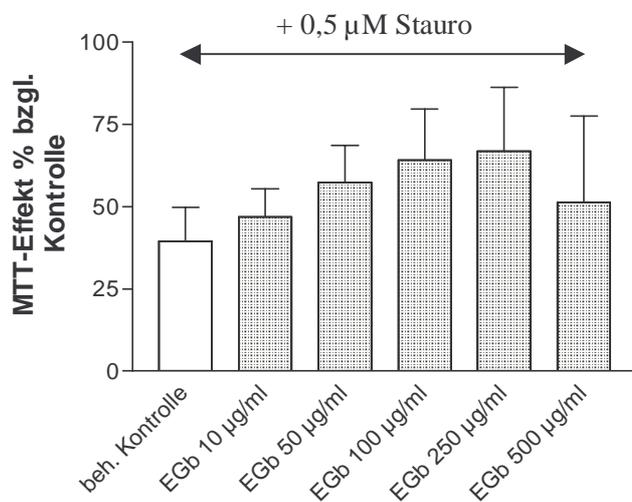
#### 3.3.3.1 MTT-Effekte nach Koinkubation von Staurosporin 0,5 $\mu$ M und Ginkgo biloba an PC-12 Zellen

Die folgenden Untersuchungen wurden mit Hilfe des MTT-Assays ausgewertet. Als zytotoxisches Agens wurde zunächst Staurosporin in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ M ausgewählt, welches den MTT-Effekt bezüglich Kontrolle auf ungefähr 40 % zu hemmen vermag. Staurosporin wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Ginkgo biloba-Extrakt EGb 761 (10 – 500  $\mu$ g/ml) und verschiedenen Konzentrationen Quercetindihydrat (1 - 100  $\mu$ M), als einem der wichtigsten Vertreter der Flavonoid-Komponenten, für 24 Stunden koinkubiert. Der Versuch wurde an sechs verschiedenen Tagen (jeweils als Dreifachbestimmung) durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob Ginkgo biloba-Extrakt bzw. Quercetindihydrat selbst den MTT-Effekt an unbehandelten Zellen (basaler MTT-Effekt) beeinflussen. In jedem Experiment wurden die MTT-Absorptionen um die aus den eingesetzten Konzentrationen an EGb 761-Extrakt und Quercetindihydrat resultierenden Eigenfärbungen korrigiert.

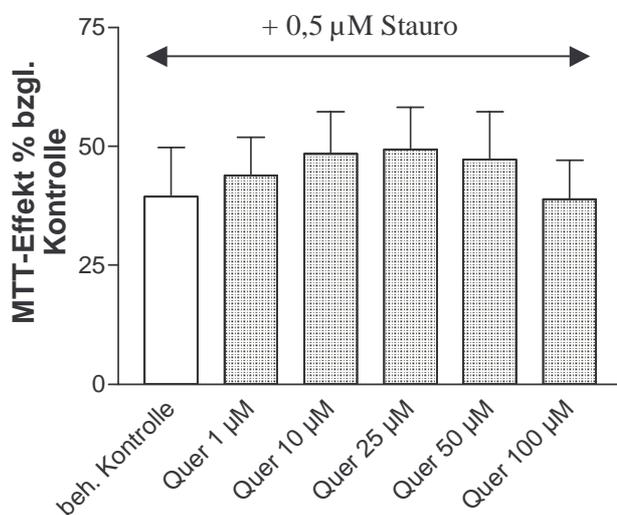
Die in diesem Experiment eingesetzten Ginkgo biloba-Konzentrationen und die höchste verwendete Konzentration an Lösungsmittel DMSO hatten keinen Einfluß auf den basalen MTT-Effekt (Daten nicht gezeigt). Bei den eingesetzten Quercetindihydrat-Konzentrationen zeigte nur die höchste von 100  $\mu$ M eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) des basalen MTT-Effekts bezüglich Kontrolle auf 81 % (Daten nicht gezeigt), was dafür spricht, daß eine Konzentration von 100  $\mu$ M Quercetindihydrat schon toxische Effekte besitzt.

Abb. 48 und 49 zeigen, daß Ginkgo biloba Extakt EGb 761 und Quercetindihydrat die durch Staurosporin induzierte Abnahme des MTT-Effektes nicht zu hemmen vermögen. Bei EGb 761 ist eine leichte, aber nicht signifikante Verbesserung der durch Staurosporin bedingten

Abnahme des MTT-Effektes erkennbar (unbehandelte Kontrolle entspricht 100 % MTT-Effekt).



**Abb. 48:** MTT-Effekt verschiedener Konzentrationen EGb 761 nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (n = 6) an PC 12-Zellen; Mittelwert ± SD; ANOVA: n.s.



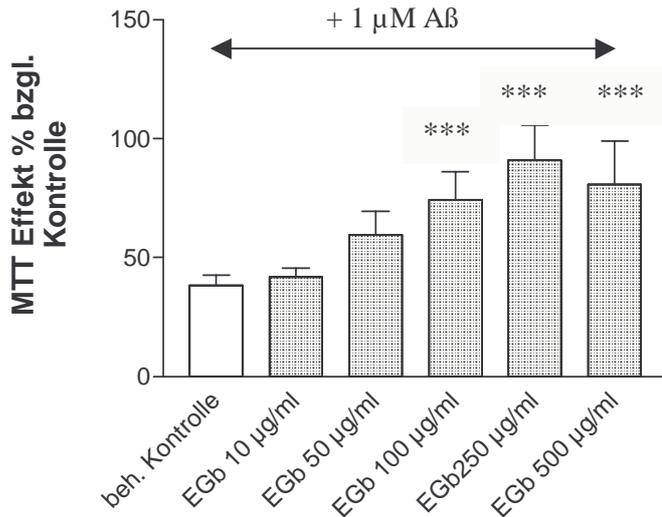
**Abb. 49:** MTT-Effekt verschiedener Konzentrationen Quercetindihydrat nach Apoptoseinduktion mit Staurosporin (n = 6) an PC 12-Zellen; Mittelwert ± SD; ANOVA: n.s.

### 3.3.3.2 MTT-Effekte nach Koinkubation von A $\beta$ 1 $\mu$ M und Ginkgo biloba an PC-12 Zellen

Für weitere Untersuchungen wurde vollständig aggregiertes A $\beta_{25-35}$  (Vorinkubation 1-2 Stunden) als zytotoxisches Agens mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M ausgewählt, welche den MTT-Effekt bezüglich Kontrolle – ähnlich Staurosporin - auf ungefähr 40 % zu hemmen vermag. A $\beta$  wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Ginkgo biloba-Extrakt EGb 761 (10 – 500  $\mu$ g/ml) und verschiedenen Konzentrationen Quercetindihydrat (1 – 100  $\mu$ M), als einem der wichtigsten Vertreter der Flavonoid-Komponenten, für 24 Stunden koinkubiert. Der Versuch wurde an fünf verschiedenen Tagen (jeweils Dreifachbestimmung) durchgeführt. Auch hier wurde vorab untersucht, ob Ginkgo biloba-Extrakt bzw. Quercetindihydrat den MTT-Effekt an unbehandelten Zellen (basaler MTT-Effekt) beeinflussen können. Um die entsprechenden Eigenabsorptionen des Extraktes bzw. Quercetindihydrates in der jeweiligen Konzentration wurde korrigiert.

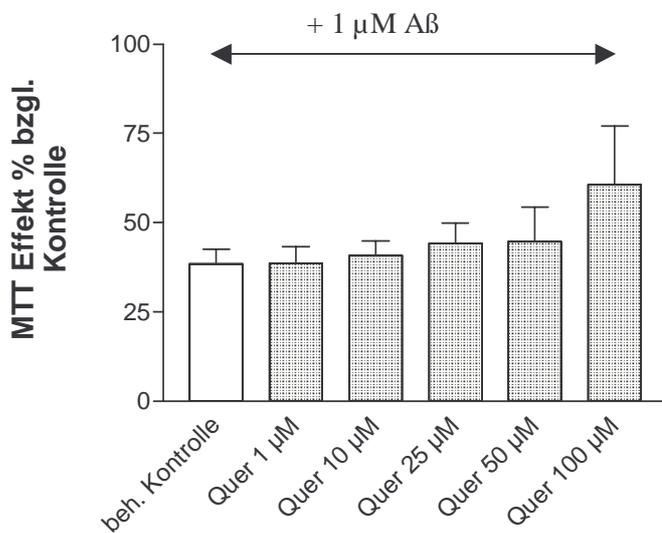
Ginkgo biloba-Extrakt hatte in keiner der getesteten Konzentration einen Einfluß auf die basalen MTT-Effekte. Bei Quercetindihydrat bewirkte wiederum nur die höchste Konzentration von 100  $\mu$ M eine signifikante Abnahme ( $p < 0,001$ ) des MTT-Effektes bezüglich Kontrolle auf 75 % (Daten nicht gezeigt).

Abb. 50 zeigt, daß Ginkgo biloba konzentrationsabhängig die durch A $\beta$  induzierte Apoptose zu hemmen vermag. Den größten Effekt zeigt die Konzentration 250  $\mu$ g/ml, die die durch A $\beta$  bedingte Abnahme des MTT-Effektes von 61 % auf 9 % Abnahme bezogen auf die unbehandelte 100 %-Kontrolle verringern kann (von 39 % MTT-Effekt unter 1  $\mu$ M A $\beta$  auf 91 % MTT-Effekt unter 1  $\mu$ M A $\beta$  + 250  $\mu$ g/ml EGb 761 bzgl. Kontrolle).



**Abb. 50:** MTT-Effekt verschiedener Konzentrationen EGb 761 nach Apoptoseinduktion mit Aβ 25-35 (n = 5) an PC 12-Zellen; Mittelwert ± SD; ANOVA:\*\*\* p < 0,001 EGb 500, 250 oder 100 µg/ml vs. Aβ 1µM

Quercetindihydrat zeigt in einer Konzentration von 100 µM eine signifikante Verringerung (p < 0,01) der Aβ-bedingten Abnahme des MTT-Effektes von 61 % auf 39 % Abnahme bzgl. Kontrolle (Abb. 51).



**Abb. 51:** MTT-Effekt verschiedener Konzentrationen Quercetindihydrat nach Induktion mit Aβ<sub>25-35</sub> (n = 5) an PC 12-Zellen; Mittelwert ± SD; ANOVA: \*\* p < 0,01 Quer 100 µM vs. Aβ 1µM

Es fällt auf, daß trotz der durch 100 µM Quercetindihydrat bedingten basalen MTT-Effekt-Abnahme dieselbe Konzentration nach Induktion mit Aβ zu einer MTT-Effekt-Zunahme führt. Es werden möglicherweise Mechanismen antagonisiert, die mit der Aβ-induzierten

---

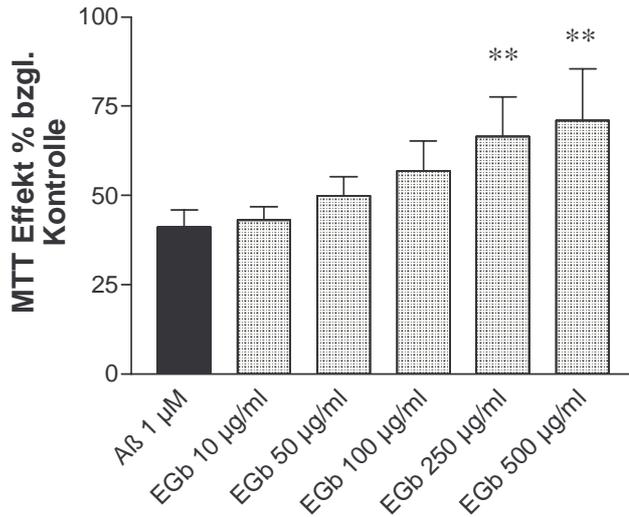
Abnahme des MTT-Effektes in Zusammenhang stehen, nicht jedoch mit den basalen MTT-Effekten.

### 3.3.3.3 MTT-Effekte nach Präinkubation mit Ginkgo biloba und anschließender Induktion mit A $\beta$ 1 $\mu$ M an PC-12 Zellen

Um zu untersuchen, ob die zellprotektiven Eigenschaften des Ginkgo biloba bei der Koinkubation mit A $\beta$  (s. Abb. 50) auf eine direkte Interaktion von Ginkgo biloba-Bestandteilen und A $\beta$  zurückzuführen sind, wurde als nächstes 24 Stunden mit Ginkgo biloba vorinkubiert, danach das Medium entfernt und anschließend vier Stunden mit A $\beta$  1  $\mu$ M MTT-Effekte induziert. Zur Untersuchung auf basale Effekte wurde 24 Stunden mit Ginkgo biloba vorinkubiert und anschließend für vier Stunden in Kulturmedium inkubiert. Die entsprechenden Eigenabsorptionen der eingesetzten Ginkgo biloba / Quercetindihydrat-Konzentrationen wurden berücksichtigt. Der Versuch wurde an vier unabhängigen Versuchstagen jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt.

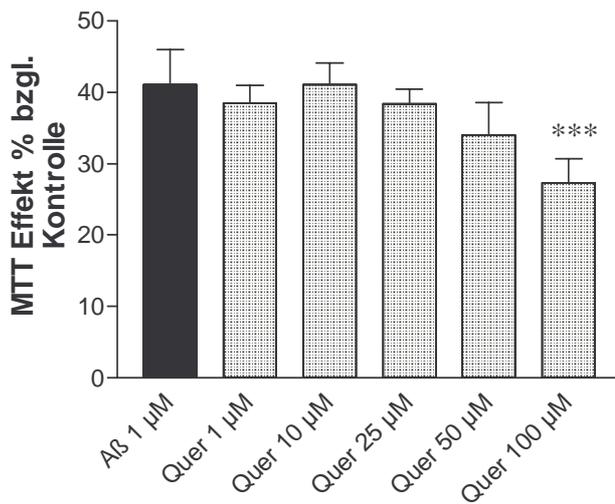
Die eingesetzten Ginkgo biloba-Konzentrationen ergaben keinen Effekt auf die basalen MTT-Effekte. Bei den eingesetzten Quercetindihydrat-Konzentrationen zeigte sich eine signifikante Abnahme des MTT-Effektes bezüglich Kontrolle durch 100  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ) auf 54 % und durch 50  $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) auf 70 % (Daten nicht gezeigt).

Präinkubation mit EGb 761 ergab konzentrationsabhängig eine Protektion der durch A $\beta$  1  $\mu$ M induzierten MTT-Abnahme. Wie Abb. 52 zu entnehmen ist, zeigten die Konzentrationen 250  $\mu$ g/ml und 500  $\mu$ g/ml signifikante Effekte.



**Abb. 52:** MTT-Effekt nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen EGb 761 und anschl. Apoptoseinduktion mit Aβ<sub>25-35</sub> (n = 4) an PC 12-Zellen; Mittelwert ± SD; ANOVA: \*\* p < 0,01 EGb 500 μg/ml od. 250 μg/ml vs. Aβ 1 μM

Durch Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Quercetindihydrat konnten keine protektiven Effekte gegenüber der Aβ-induzierten MTT-Abnahme detektiert werden. Im Gegenteil, höhere Konzentrationen an Quercetindihydrat zeigten eher eine Verstärkung der Aβ-induzierten MTT-Abnahme (s. Abb. 53).



**Abb. 53:** MTT-Effekt nach Präinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Quercetindihydrat und anschl. Apoptoseinduktion mit Aβ<sub>25-35</sub> (n = 4) an PC 12-Zellen; Mittelwert ± SD; ANOVA: \*\*\* p < 0,001 Quer 100 μM vs. Aβ 1 μM

### 3.3.3.4 Zeitabhängigkeit der Präinkubation für zwei und vier Stunden

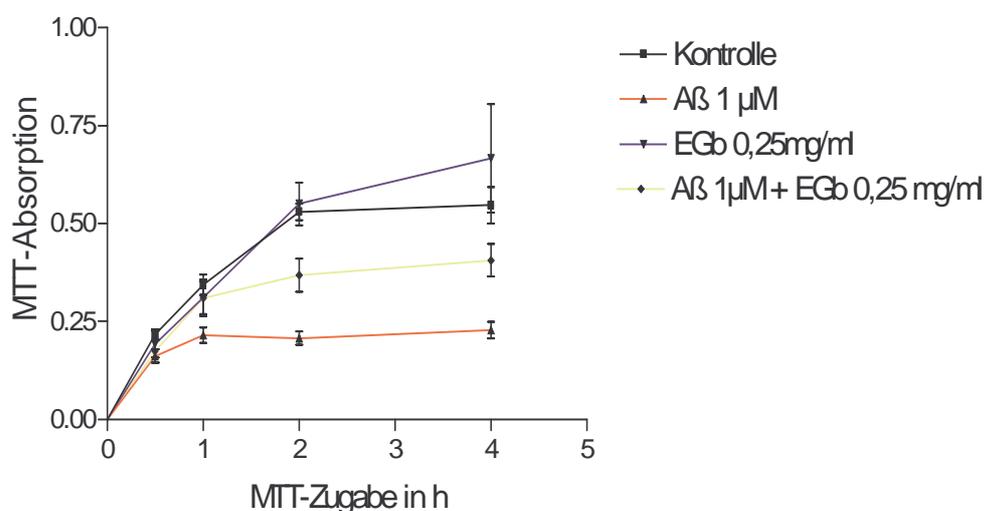
Um zu überprüfen, ob durch die lange Präinkubation von 24 Stunden mit EGb 761 frühe protektive Effekte verdeckt worden sein könnten, wurden zusätzlich Experimente mit zwei und vier Stunden Vorinkubation und anschließender Induktion von MTT-Effekten durch A $\beta$  durchgeführt.

Es zeigte sich, daß sich die protektiven Effekte schon zwischen zwei und vier Stunden abzeichneten, die größten protektiven Effekte jedoch nach 24 Stunden zu detektieren waren (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3.5 Abhängigkeit der MTT-Absorptionen von der MTT-Zugabezeit an PC-12 Zellen

Um möglicherweise etwas über den Mechanismus der Protektion der A $\beta$ -induzierten MTT-Effekte durch EGb 761 zu erfahren, wurde eine Untersuchung der Abhängigkeit der MTT-Absorption von der Zugabezeit durchgeführt. Dazu wurde die EGb 761-Konzentration eingesetzt, die bei Koinkubation mit A $\beta$  1  $\mu$ M für 24 Stunden den größten protektiven Effekt zeigte.

In Abb. 54 sind die MTT-Absorptionen der unbehandelten Kontrolle, der 1  $\mu$ M A $\beta$  behandelten Zellen, der mit EGb 761 250  $\mu$ g/ml behandelten Zellen und der durch Koinkubation von A $\beta$  1  $\mu$ M und EGb 761 250  $\mu$ g/ml behandelten Zellen abgebildet. Insgesamt wurden die Zellen 24 Stunden inkubiert, wovon 0,5, 1, 2 oder 4 Stunden auf die MTT-Zugabezeit entfielen.



**Abb. 54:** Abhängigkeit des MTT-Effektes von der Zugabezeit des MTT-Reagenzes an PC 12-Zellen; Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 2, jew. Dreifachbestimmung)

Die Behandlung mit A $\beta$  1  $\mu$ M für 24 Stunden zeigt eine deutliche Abnahme des MTT-Effektes im Vergleich zur Kontrolle. Eine Arbeit von Leutz (Leutz 2001) zeigt, daß unter diesen Bedingungen (1  $\mu$ M A $\beta$ <sub>25-35</sub> für 24 Stunden an PC-12 Zellen) keine Zytotoxizität im LDH-Assay gezeigt werden kann. Die Effekte auf die MTT-Absorption sind also nicht über zytotoxische Eigenschaften des A $\beta$  zu erklären. Diskutiert wird, daß A $\beta$  Effekte auf den Transport des gebildeten Formazansalzes von intra- nach extrazellulär haben könnte. Eine Theorie ist, daß A $\beta$  die Exozytose des Formazansalzes zu beschleunigen vermag. Die nach außen transportierten Formazansalze kristallisieren zu Nadeln aus, die sich an der Außenseite der Membran ablagern und damit evtl. den Hineintransport von MTT-Reagenz vermindern bzw. verlangsamen. Deshalb wäre die Menge des während der Inkubationszeit insgesamt umgesetzten MTT-Reagenzes zu farbigem Formazansalz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vermindert und die MTT-Absorptionsabnahme plausibel.

Wie der Kurvenverlauf der mit EGb 761 behandelten Zellen vermuten läßt, ist die Umsetzung des MTT-Reagenzes während der Inkubationszeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verlangsamt und hat nach vier Stunden Zugabezeit des MTT-Reagenzes noch kein Plateau erreicht. Allerdings scheint die maximal umgesetzte Menge MTT höher zu liegen als die der unbehandelten Kontrolle. Man könnte spekulieren, daß EGb 761 die Exozytose des umgesetzten Formazansalzes auf die extrazelluläre Seite verlangsamt, damit die Ablagerung der Formazankristalle an der Außenseite der Membran verzögert und dadurch evtl. die Nachlieferung von MTT-Reagenz ins Zellinnere länger unbehindert bleibt. So wäre die zur Umsetzung zur Verfügung stehende Menge MTT-Reagenz - über die Inkubationszeit gesehen - im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle größer, was die höheren MTT-Absorptionen erklären könnte.

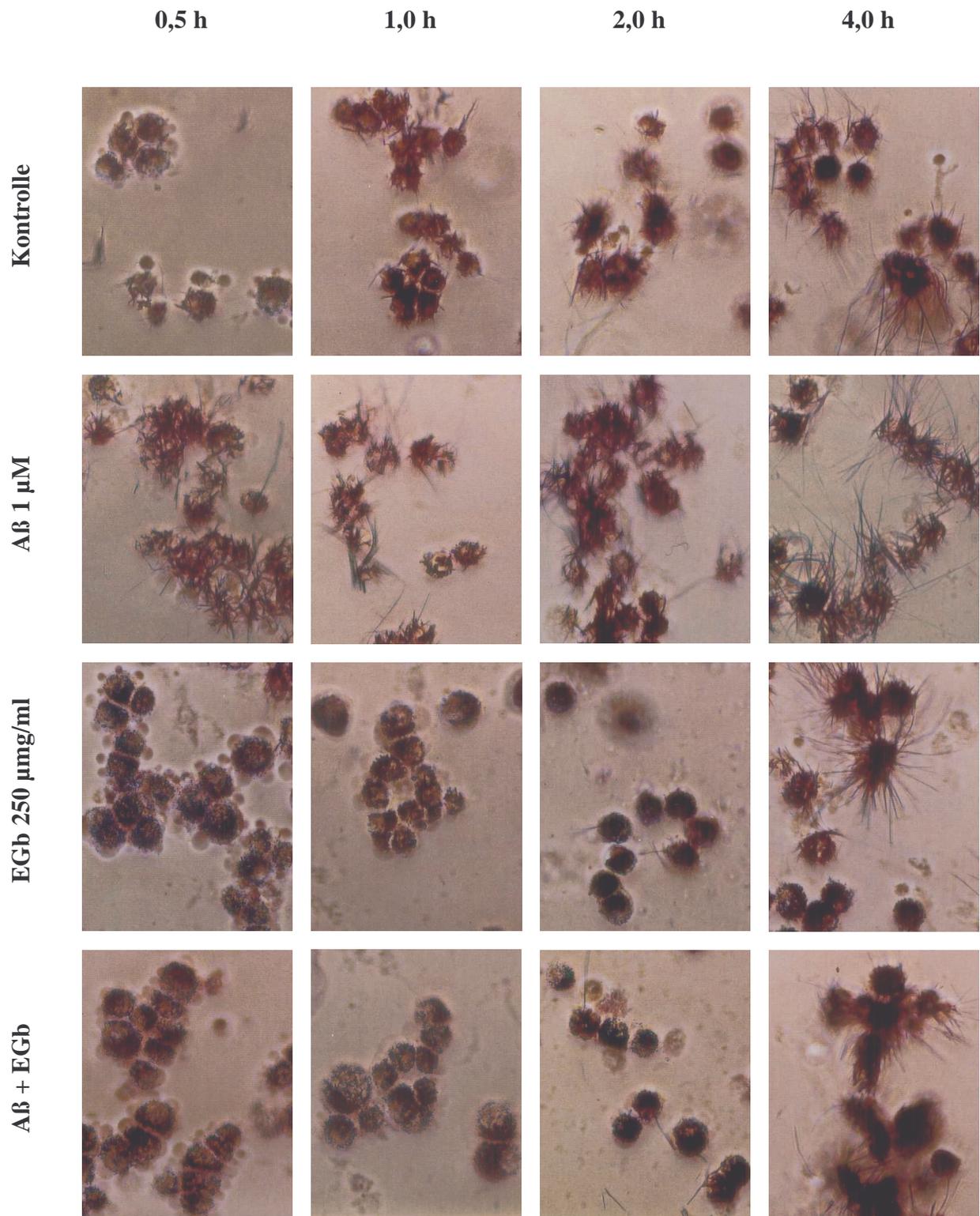
Betrachtet man den Kurvenverlauf (Abb. 54, gelbe Kurve) nach Koinkubation von 1  $\mu$ M A $\beta$  und 250  $\mu$ g/ml EGb 761, so scheint EGb 761 die durch A $\beta$  induzierte MTT-Absorptionsabnahme zu antagonisieren.

Stimmt die Theorie der Beeinflussung der Exozytose durch A $\beta$  und/oder EGb 761, so kann man evtl. Veränderungen der Membraneigenschaften (in entgegengesetzter Weise) als gemeinsamen Wirkungsmechanismus von A $\beta$  und EGb 761 vermuten.

---

Die durch die Ergebnisse der Kinetikuntersuchung postulierten Theorien hinsichtlich der Vorgänge der Umsetzung des MTT-Reagenzes in das farbige Formazansalz und der Einflüsse des Aß und EGb 761 darauf sollten durch mikroskopische Aufnahmen überprüft werden. Der Versuchsansatz wurde identisch wiederholt und anschließend nicht photometrisch quantifiziert, sondern mikroskopisch analysiert. Festgehalten sind typische Ausschnitte aus den einzelnen Ansätzen.

Abb. 55 zeigt die nach verschiedenen MTT-Zugabezeiten und unterschiedlichen Behandlungen erhaltenen Aufnahmen.



**Abb. 55:** Fotografische Aufnahmen der Abhängigkeit der Formazanbildung von der MTT-Zugabezeit am Beispiel unterschiedlich behandelter PC 12-Zellen

---

An der unbehandelten Kontrolle ist deutlich zu erkennen, wie die Ablagerung der Formazankristalle an der Außenseite der Membran im Laufe der Zeit einsetzt und bis zu vier Stunden zunimmt. Auch die Zunahme der Farbintensität (von lokal begrenzten Bereichen bis über die gesamte Zelle verteilt) ist gut zu verfolgen. Bei der A $\beta$ -Behandlung ist im Vergleich zur Kontrolle das sehr frühe Einsetzen der Nadelablagerung an der Membranaußenseite (bereits nach einer halben Stunden) zu erkennen. Des weiteren ist die Intensität der Färbung prinzipiell deutlich schwächer als bei den zeitlich entsprechenden Kontrollen. Dem gegenüber zeigen die EGb 761 behandelten Zellen ein sehr spätes Einsetzen der Ablagerung der gebildeten Formazankristalle an der Membran und etwas höhere Farbintensitäten im Vergleich zur Kontrolle. Bei Koinkubation von A $\beta$  und EGb 761 sind die zuvor durch A $\beta$  induzierten, bezüglich der Kontrolle beobachteten Veränderungen deutlich inhibiert: Die frühe Nadelbildung ist gehemmt, und die Farbintensität hat sich in Richtung unbehandelte Kontrolle verstärkt.

Vergleicht man die durch Photometrie quantifizierten Ergebnissen (s. Abb. 54) mit den fotografischen Aufnahmen (s. Abb. 55), so decken sich die Befunde. Eine alleinige Behandlung mit A $\beta$  steigert den MTT-Effekt bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, eine Behandlung nur mit EGb 761 verringert den MTT-Effekt verglichen mit der Kontrolle und A $\beta$  und EGb 761 antagonisieren sich in ihren MTT-Effekten bei gleichzeitiger Inkubation. Diese Versuche stützen die Theorien über die Beeinflussung von Membraneigenschaften und Exozytose-Vorgängen durch A $\beta$  und/oder EGb 761.

### 3.3.4 MTT-Versuche an menschlichen Lymphozyten (PBMC)

Im Sinne eines pharmakodynamischen Ansatzes wäre es sinnvoll, ein *in vitro*-Modell an Lymphozyten zu etablieren. Deshalb sollte im folgenden versucht werden, die beobachteten protektiven Effekte des Ginkgo biloba nach A $\beta$ -Behandlung der PC 12-Zellen im MTT-Assay an Lymphozyten zu bestätigen.

Mit verschiedenen A $\beta$ -Konzentrationen (bis zu 10  $\mu$ M) konnten an Lymphozyten keine nennenswerten MTT-Effekte ausgelöst werden, so daß dieser Ansatz als Modell entfiel und ein anderer Induktor benutzt werden mußte.

Eine Behandlung mit Cholesterin (50  $\mu$ M) erbrachte einen MTT-Effekte von 60 % bezüglich der Kontrolle. Allerdings konnten in diesem Ansatz keine protektiven Effekte durch EGb 761 (10 – 500  $\mu$ g/ml) nach Koinkubation für 24 Stunden detektiert werden.

#### *Fazit*

Der Versuch der Etablierung eines geeigneten *in vitro*-Modells für einen pharmakodynamischen Ansatzes scheiterte aufgrund fehlender oder nicht ausreichend sensitiver Effekte.

### 3.4 Vergleichende Bioverfügbarkeitsstudie zweier Ginkgo biloba-haltiger Fertigpräparate

Unterschiede in der pharmazeutischen Qualität von Präparaten können sich *in vivo* bemerkbar machen. Aus diesem Grunde werden als Beleg für die therapeutische Äquivalenz verschiedener Präparate Bioäquivalenzstudien gefordert. Um zu überprüfen, ob die gefundenen unterschiedlichen pharmazeutischen Qualitäten der Ginkgo-biloba-Produkte des U.S.-amerikanischen Marktes eine *in vivo*-Relevanz haben, wurden zwei unterschiedlich schnell freisetzende Präparate in einer vergleichenden Bioverfügbarkeitsstudie untersucht (s. Kapitel 2.2.3).

#### 3.4.1 Vorstudienvalidierung

Vor der Messung der in der klinischen Studie gewonnenen Blutproben wurde eine Vorstudienvalidierung durchgeführt, welche zeigen sollte, daß die zur Analyse der Blutproben vorgesehene Methode geeignet bzw. valide ist.

##### 3.4.1.1 Spezifität

Die Spezifität der Methode wurde durch Überprüfung der Chromatogramme von Leerplasma ( $n = 6$ ) zu den entsprechenden Retentionszeiten für Ginkgolid A, B und Bilobalid bestätigt.

##### 3.4.1.2 Linearität der Kalibriergeraden und Bestimmungsgrenze

Sowohl für Ginkgolid A und B im Bereich von 1 – 30 ng/ml als auch für Bilobalid im Bereich von 1 - 60 ng/ml konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Plasmakonzentration und dem Detektorsignal mit einem Korrelationskoeffizienten  $> 0,992$  gezeigt werden. Jede Kalibriergerade wurde als Sechs-Punkt-Kalibrierung jeweils dreifach vermessen. Die Richtigkeit ( $n = 3$ ) konnte mit  $< 7 \%$  und die Genauigkeit mit  $< 11 \%$  angegeben werden.

Als Bestimmungsgrenze wurde sowohl für die Ginkgolide als auch für Bilobalid 1 ng/ml ermittelt. Die Richtigkeit ( $n = 3$ ) an dieser Bestimmungsgrenze wurde mit  $< 5 \%$  und die Genauigkeit mit  $< 13 \%$  ermittelt.

### 3.4.1.3 Genauigkeit und Richtigkeit anhand der Qualitätskontrollproben (QC)

Zur Herstellung von Qualitätskontrollproben wurde Leerplasma mit bestimmten Konzentrationen von Ginkgolid A, B, Bilobalid und internem Standard versetzt. Es wurde jeweils eine Konzentration an der Bestimmungsgrenze, eine kleine, eine mittlere und eine hohe Konzentration bezüglich des Kalibrierbereiches gewählt. Die Richtigkeit ( $n = 3$ ) wurde mit  $< 11 \%$  und die Genauigkeit mit  $< 9 \%$  bestimmt.

### 3.4.1.4 Stabilitätstests

Die Einfrier-/Auftau-Stabilität wurde anhand von Qualitätskontrollproben niedriger und hoher Konzentration überprüft. Sowohl nach vier Wochen Einfrieren bei  $-18 \text{ °C}$  als auch nach dreimaligem Auftauen und Wiedereinfrieren war keine Degradation an Ginkgoliden oder Bilobalid festzustellen. Auch die Stabilität von Proben im Autosampler über 24 Stunden wurde überprüft und keine Veränderung gefunden.

### 3.4.1.5 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde bestimmt durch Vergleich von einem Set Eichproben, die aus Plasma extrahiert wurden, mit einem Set Kalibrierproben, die nicht extrahiert wurden. Kalibrierproben, die durch Lösen von Ginkgoliden, Bilobalid und internem Standard in Methanol, anschließendem Verdunsten des Lösungsmittels und Derivatisierung mit BSTFA hergestellt wurden, dienten als nicht extrahierte Proben. Als extrahiert galten Proben, die nach Zuspiken von Kalibrierlösungen zu Leerplasma dem Verfahren der Probenaufbereitung unterzogen und anschließend mit BSTFA derivatisiert wurden. Aus diesen Proben wurde jeweils eine Kalibriergerade aufgenommen. Aus der Steigung der beiden Kalibrierkurven (extrahierte vs. nicht-extrahierte) wurde eine Wiederfindung für alle drei Substanzen  $> 90 \%$  errechnet.

## 3.4.2 Validierung während der Routine-Analyse

Die gesamten Plasmaproben wurden in sechs Sequenzen analysiert, wobei jeweils Kalibrier-Qualitätskontroll- und Plasmaproben vermessen wurden.

### 3.4.2.1 Kalibriergeraden

Alle Kalibriergeraden für die Bestimmung des Ginkgolid A, B und Bilobalid ergaben einen linearen Zusammenhang und einen Korrelationskoeffizient von mindestens 0,984.

---

Die Richtigkeit und die Tag-zu-Tag-Abweichung über die sechs Tage lag bei < 10 % bzw. < 8 %.

#### 3.4.2.2 Qualitätskontrollproben

Die Richtigkeit und die Genauigkeit über die sechs Sequenzen ergab < 12 % bzw. < 14 %.

Daher wurden die Ergebnisse aller sechs Sequenzen als valide angesehen.

### 3.4.3 Studienergebnisse

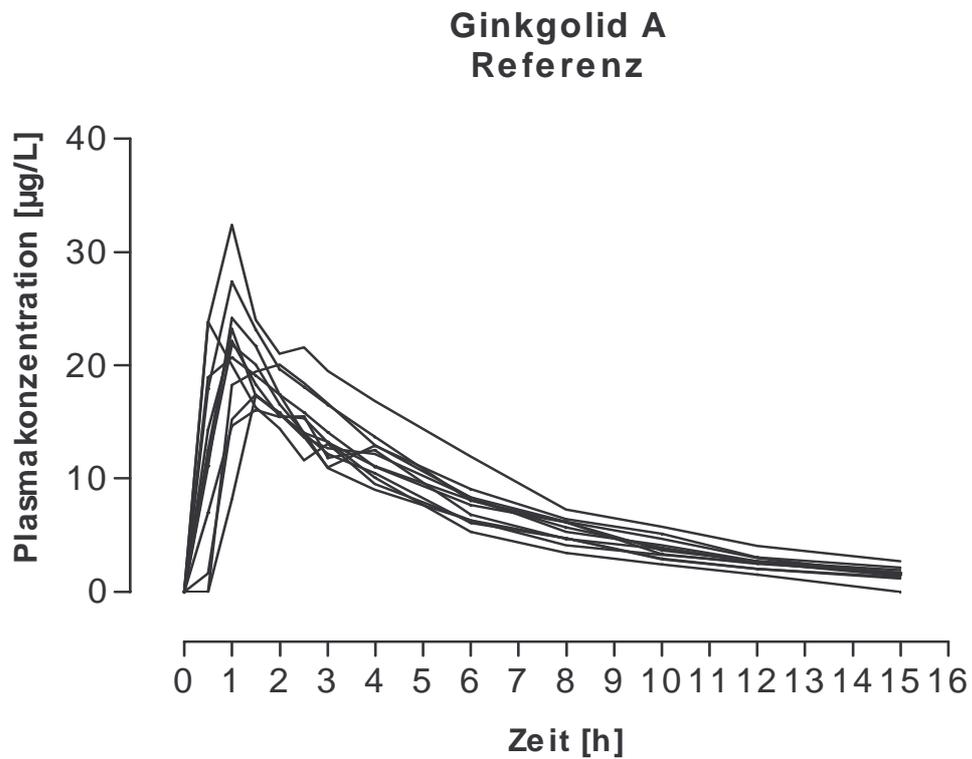
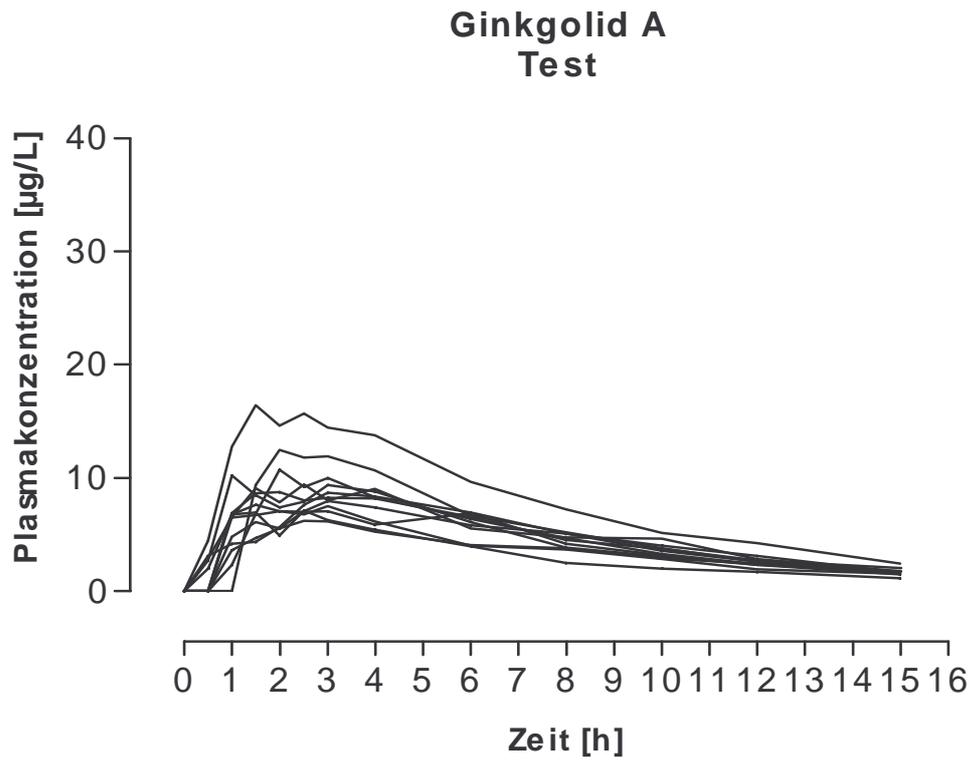
#### 3.4.3.1 Probandkollektiv

Das Probandenkollektiv wurde gemäß den Vorgaben der CPMP Note for Guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence (CPMP/EWP/QWP/1401/98) zusammengestellt.

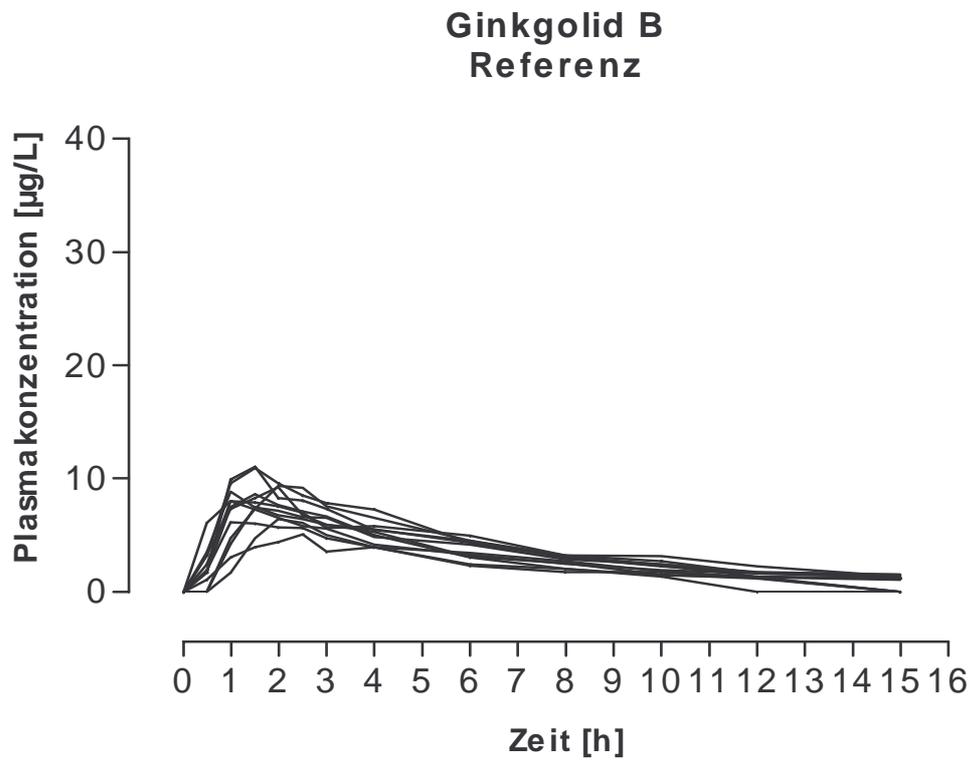
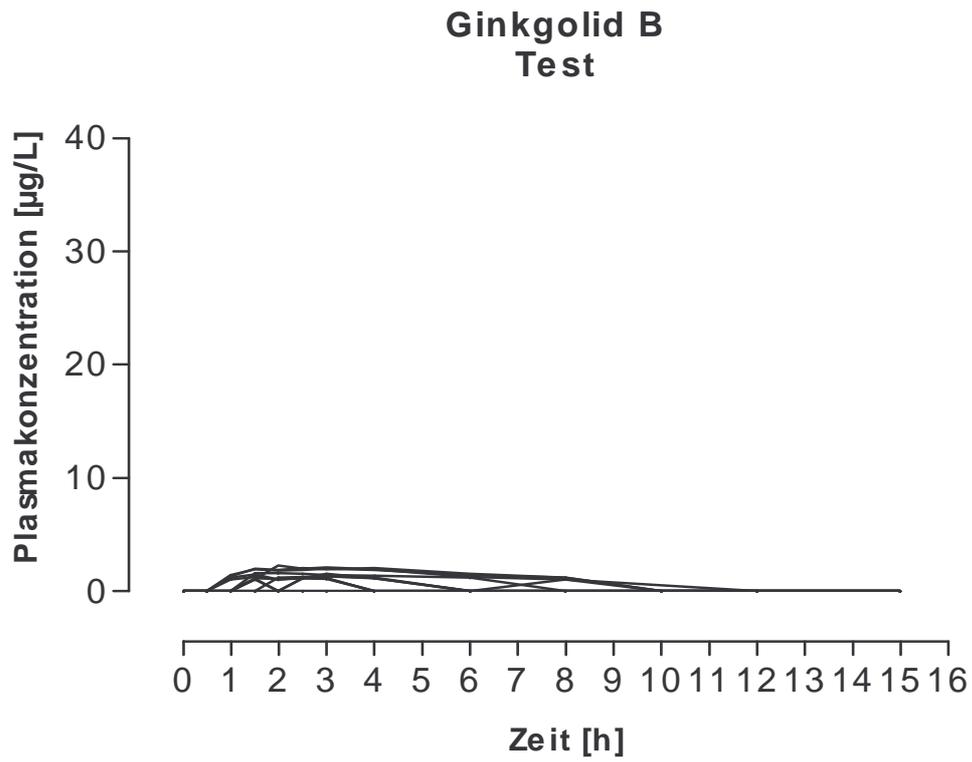
#### 3.4.3.2 Plasmakonzentration-Zeit-Verläufe

Abb. 56, 57 und 58 stellen die Plasmakonzentration-Zeit-Verläufe der einzelnen Probanden für das Test- (Centrum Herbals: Ginkgo biloba) und das Referenzprodukt (Nature's Way: Ginkgold) gegenüber. Untersucht wurden jeweils die pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe Ginkgolid A, B und Bilobalid. Die Plasmaprofile für das Referenz- und Testprodukt zeigen relativ geringe interindividuelle Streuungen.

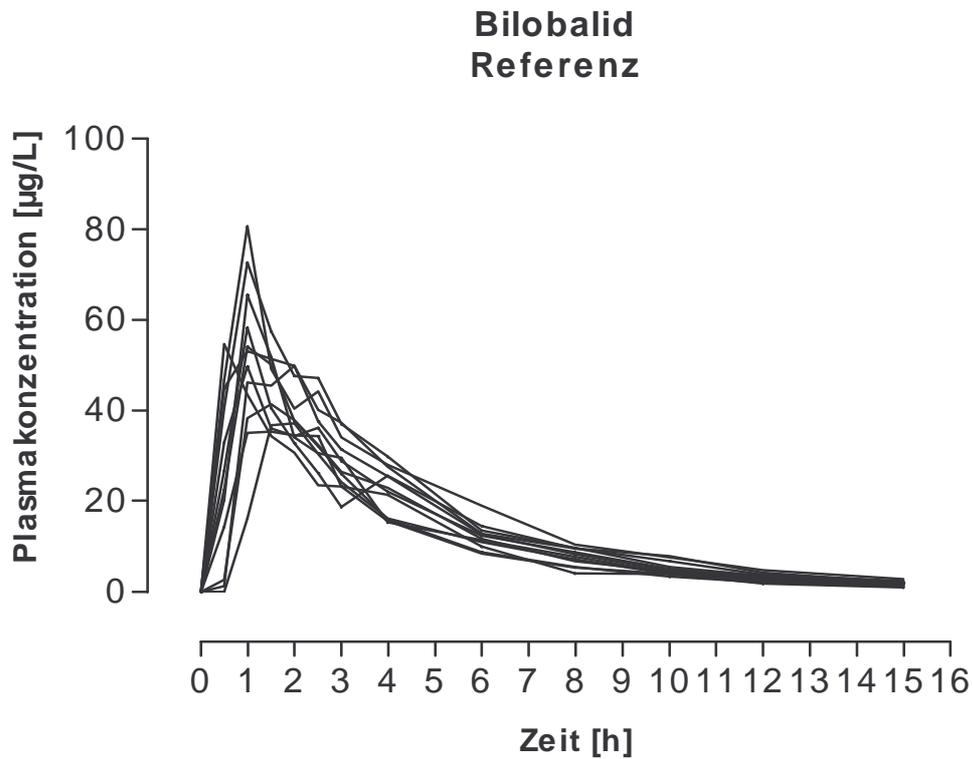
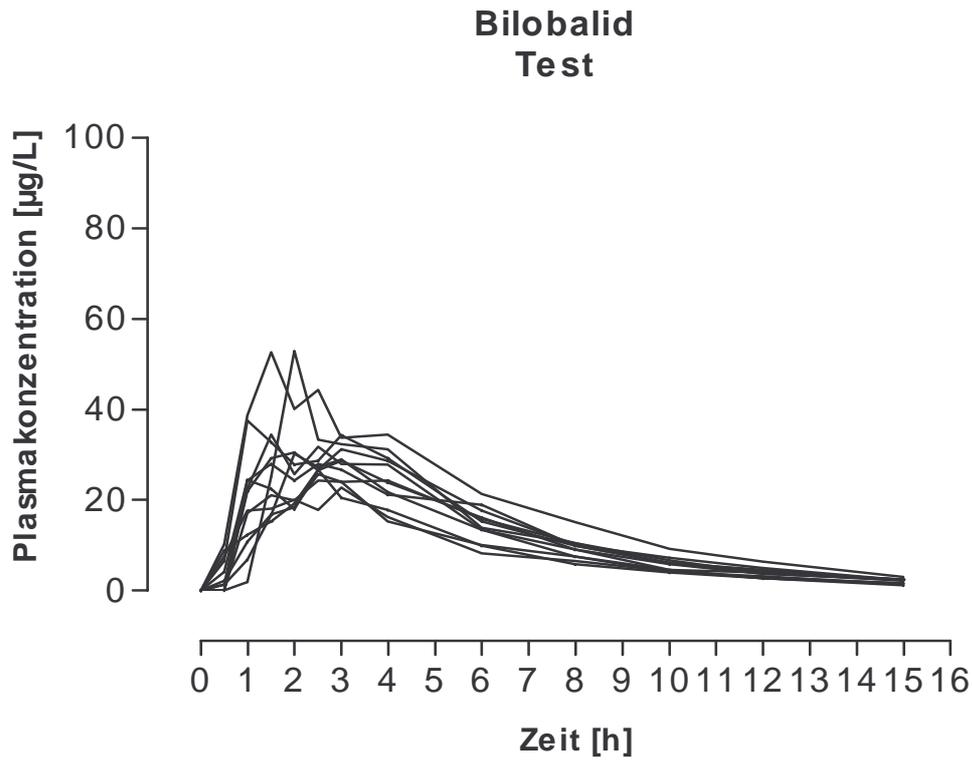
In Abbildung 59 sind die Mittelwertskurven der 12 Probanden für Referenz- und Testprodukt aufgetragen. Allein aus der Betrachtung der Kurvenverläufe - ohne statistische Berechnung - kann man Bioäquivalenz vermuten, da sich nicht nur die Konzentrationsmaxima deutlich voneinander abheben, sondern auch die  $t_{\max}$ - und die  $AUC_{\text{tot}}$ -Werte des Referenz- und Testpräparates voneinander unterscheiden.



**Abb. 56:** Plasmakonzentration-Zeit-Verläufe der einzelnen Probanden (n = 12) für Ginkgolid A des Test- und des Referenzproduktes



**Abb. 57:** Plasmakonzentration-Zeit-Verläufe der einzelnen Probanden (n = 12) für Ginkgolid B des Test- und des Referenzproduktes



**Abb. 58:** Plasmakonzentration-Zeit-Verläufe der einzelnen Probanden (n = 12) für Bilbalid des Test- und des Referenzproduktes

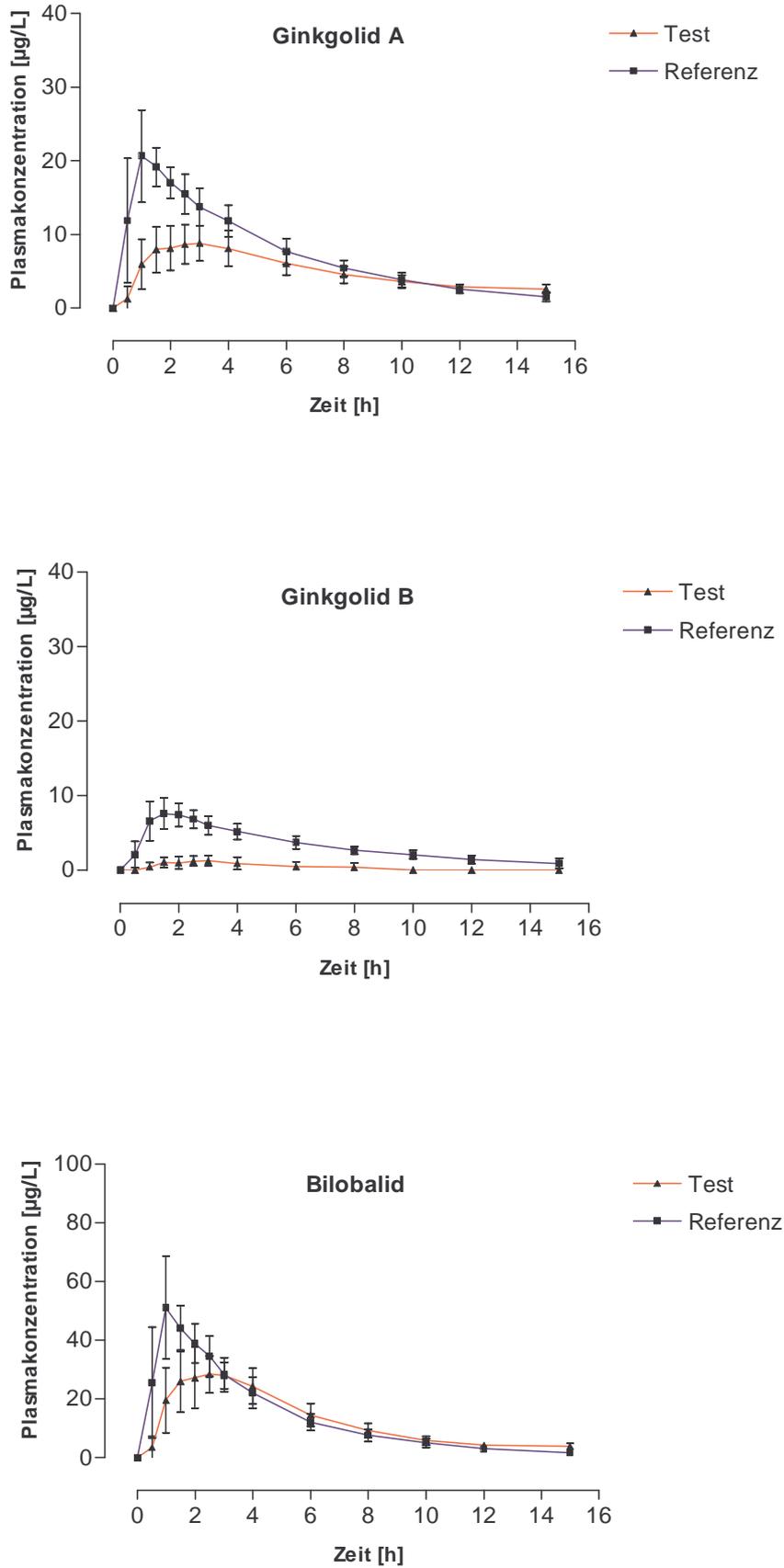


Abb. 59: Mittelwertskurven von Ginkgolid A, B und Bilobalid für das Test- und Referenzprodukt (Mean ± SD, n = 12)

### 3.4.3.3 Pharmakokinetische Zielgrößen

Die pharmakokinetischen Parameter wurden von zwölf Probanden, die alle die Studie beendeten, direkt aus den gemessenen Plasmakonzentrationen modellunabhängig berechnet, wobei alle Konzentrationen, die unterhalb der Bestimmungsgrenze (LLQ) lagen, als Null gewertet wurden. Die Tabellen 22 - 24 stellen die pharmakokinetischen Parameter jeweils eines relevanten Inhaltsstoffes des Referenz- und Testpräparates gegenüber.

$C_{\max}$  wurde direkt als höchster Wert aus den gemessenen Plasmakonzentrationen abgelesen.

Als  $t_{\max}$  gilt der Blutabnahmezeitpunkt, der mit  $C_{\max}$  korrespondierte. Die terminale Halbwertszeit wurde mit Hilfe der Formel  $t_{1/2} = (\ln 2) / \lambda_z$  nach Ermittlung der Steigung der terminalen Eliminationsphase ( $\lambda_z$ ) aus der nicht log-transformierten Plasmakonzentration-Zeit-Kurve errechnet.  $AUC_{0-t_{\text{last}}}$  wurde nach der linearen Trapezregel und die gesamte AUC mit der Formel  $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_{\text{last}}} + C_{\text{last}} / \lambda_z$  errechnet, wobei  $C_{\text{last}}$  die letzte quantifizierte Plasmakonzentration darstellt.

GKA	Referenzpräparat					Testpräparat				
	Proband	AUC <sub>tot</sub> [h*ng/ml]	C <sub>max</sub> [ng/ml]	t <sub>max</sub> [h]	t <sub>1/2</sub> [h]	AUC <sub>tot</sub> [h*ng/ml]	C <sub>max</sub> [ng/ml]	t <sub>max</sub> [h]	t <sub>1/2</sub> [h]	
	1	90,10	17,35	1,50	3,89	69,22	7,55	3,00	5,33	
	2	113,17	23,88	0,50	4,63	84,54	9,41	2,50	3,69	
	3	125,88	20,08	2,00	3,67	92,34	12,45	2,00	4,45	
	4	114,28	17,41	1,50	4,06	69,65	6,20	2,50	6,26	
	5	179,66	32,39	1,00	4,14	137,58	16,44	1,50	4,53	
	6	96,63	21,83	1,00	3,04	59,03	7,16	2,50	6,30	
	7	137,47	27,40	1,00	3,84	80,02	7,65	1,50	5,67	
	8	110,63	20,71	1,00	3,84	81,92	10,20	1,00	4,59	
	9	110,02	16,05	1,50	4,25	80,89	10,71	2,00	4,36	
	10	125,52	24,15	1,00	4,02	92,13	8,75	2,00	6,14	
	11	120,04	22,18	1,00	3,57	75,39	7,96	3,00	4,30	
	12	132,74	23,23	1,00	4,19	84,29	8,67	3,00	4,29	
	Arith. Mittel	121,00	22,20	1,17	3,93	83,90	9,43	2,21	4,99	
	SD	22,90	4,57	0,39	0,40	19,40	2,80	0,66	0,90	
	Geo.-Mittel	120,00	21,80			82,20	9,11			
	% CV	18,90	20,60			23,20	29,70			

**Tab. 22:** Pharmakokinetische Parameter des Test- und Referenzpräparates für Ginkgolid A

GKB	Referenz				Test				
	Proband	AUC <sub>tot</sub> [h*ng/ml]	C <sub>max</sub> [ng/ml]	t <sub>max</sub> [h]	t <sub>1/2</sub> [h]	AUC <sub>tot</sub> [h*ng/ml]	C <sub>max</sub> [ng/ml]	t <sub>max</sub> [h]	t <sub>1/2</sub> [h]
1		46,61	6,41	2,00	5,00	36,61	1,30	3,00	18,64
2		66,40	8,01	1,00	9,42	24,80	2,07	4,00	6,81
3		71,54	9,36	2,00	5,46	17,43	2,25	2,00	4,59
4		64,78	7,50	1,50	6,56	23,53	1,17	2,50	13,34
5		68,64	8,82	1,00	7,01	23,85	1,99	3,00	6,79
6		53,39	8,61	1,50	5,86	37,09	1,29	1,50	20,45
7		68,80	10,93	1,50	4,53	8,92	1,16	2,50	4,85
8		52,00	9,24	2,00	4,09	8,70	1,53	3,00	2,67
9		43,56	5,10	2,50	7,26	19,82	1,31	3,00	10,02
10		73,24	11,06	1,50	6,95	25,88	1,60	2,00	10,98
11		42,71	6,12	1,00	4,99	0,00	0,00	0,00	-
12		66,89	8,03	1,00	5,32	0,00	0,00	0,00	-
Arith. Mittel		59,90	8,27	1,54	6,04	18,90	1,31	2,21	9,91
SD		11,40	1,82	0,50	1,48	12,40	0,71	1,21	6,02
Geo.-Mittel		58,80	8,07			n.c.	n.c.		
% CV		19,00	22,00			n.c.	n.c.		

**Tab. 23:** Pharmakokinetische Parameter des Test- und Referenzpräparates für Ginkgolid B

<b>Bilobalid</b>		<b>Referenz</b>				<b>Test</b>			
<b>Proband</b>	<b>AUC<sub>tot</sub></b> [h*ng/ml]	<b>C<sub>max</sub></b> [ng/ml]	<b>t<sub>max</sub></b> [h]	<b>t<sub>1/2</sub></b> [h]	<b>AUC<sub>tot</sub></b> [h*ng/ml]	<b>C<sub>max</sub></b> [ng/ml]	<b>t<sub>max</sub></b> [h]	<b>t<sub>1/2</sub></b> [h]	
1	157,98	37,26	2,00	2,83	136,61	22,70	3,00	3,48	
2	183,04	54,70	0,50	3,56	206,43	34,52	1,50	5,48	
3	239,38	49,89	2,00	2,62	208,90	53,02	2,00	3,05	
4	187,63	41,37	1,50	2,84	142,08	24,37	2,50	3,12	
5	300,28	80,71	1,00	3,64	292,86	52,63	1,50	3,04	
6	187,16	54,12	1,00	3,12	144,97	26,73	2,50	3,82	
7	280,62	72,75	1,00	3,41	201,63	28,05	1,50	3,42	
8	248,28	53,12	1,00	3,70	223,54	37,57	1,00	3,44	
9	168,85	35,33	1,50	2,66	158,60	30,22	2,00	2,60	
10	208,59	65,63	1,00	3,53	198,53	30,49	2,00	3,78	
11	216,85	49,78	1,00	2,97	181,90	25,71	2,50	3,97	
12	228,19	58,32	1,00	3,42	202,65	31,29	3,00	3,06	
Arith. Mittel	217,00	54,40	1,21	3,19	192,00	33,10	2,08	3,52	
SD	44,10	13,60	0,45	0,40	43,60	10,10	0,63	0,73	
Geo.-Mittel	213,00	52,90			187,00	31,90			
% CV	20,30	25,00			22,80	30,50			

**Tab. 24:** Pharmakokinetische Parameter des Test- und Referenzpräparates für Bilobalid

### 3.4.4 Studienauswertung

Beide Präparate wurden gut vertragen. Es traten weder arzneimittelbezogene Nebenwirkungen auf, noch wurden unerwünschte Ereignisse beobachtet.

Unterschiede zwischen dem Test- und Referenz-Präparat konnten bezüglich der Bioverfügbarkeit der untersuchten Inhaltsstoffe Ginkgolid A, B und Bilobalid festgestellt werden. Sowohl die pharmakokinetische als auch die statistische Auswertung für  $AUC_{0-\infty}$  und  $C_{max}$  ergaben eine höhere Bioverfügbarkeit des Referenzproduktes gegenüber der des Testproduktes.

Für Ginkgolid A ergab sich bezüglich des Referenzpräparates eine geometrisch ermittelte Area Under the Curve  $AUC_{0-\infty}$  von 120 ng\*h/ml im Gegensatz zum Test-Präparat mit 82,20 ng\*h/ml. Für Bilobalid errechnete sich für das Referenz-Produkt eine  $AUC_{0-\infty}$  von 213 ng\*h/ml vs. 187 ng\*h/ml für das Test-Produkt. Für Ginkgolid B ergab sich für das Referenz-Produkt eine  $AUC_{0-\infty}$  von 58,80 ng\*h/ml. Für das Test-Produkt ließ sich aufgrund zu niedriger Plasma-Konzentrationsspiegel geometrisch keine  $AUC_{0-\infty}$  errechnen. Die arithmetisch errechnete Area Under the Curve  $AUC_{0-\infty}$  lag bei 18,90 ng\*h/ml.

Deutliche Unterschiede zwischen den Produkten zeigen sich auch an den beobachteten  $C_{max}$ -Werten. Bezüglich Ginkgolid A ergibt sich nach geometrischer Berechnung ein  $C_{max}$ -Wert von 21,80 ng/ml für das Referenz-Produkt und nur 9,11 ng/ml für das Test-Produkt, für Bilobalid 52,90 ng/ml vs. 31,90 ng/ml. Ginkgolid B ergab ein  $C_{max}$  von 8,07 ng/ml für das Referenz-Präparat, wohingegen eine geometrische Berechnung des  $C_{max}$ -Wertes für das Test-Präparat aus mathematischen Gründen nicht berechnet werden konnte. Das arithmetische Mittel für  $C_{max}$  lag bei 1,31 ng/ml.

Des weiteren ergaben sich auch deutliche Unterschiede im  $t_{max}$ : für alle drei untersuchten Inhaltsstoffe verschob sich  $t_{max}$  des Test-Präparates im Vergleich zum Referenz-Präparat zu höheren Werten. Für das Ginkgolid A ergab sich ein Unterschied von mehr als einer Stunde (Referenz: 1,17 h, Test: 2,21 h). Bezüglich Bilobalid waren die  $t_{max}$ -Werte für das Referenz-1,21 h und für das Testprodukt 2,08 h und bezüglich Ginkgolid B 1,54 h vs. 2,21 h.

Die pharmakokinetischen Parameter zeigten eine erstaunlich niedrige individuelle Variabilität (% CV) der Parameter  $AUC_{0-\infty}$  und  $C_{max}$  für das Referenzpräparat von 20 – 25 %. Diese Variabilität war beim Test-Präparat durchweg höher mit 20 - 30 % für Ginkgolid A und 50 - 60 % für Ginkgolid B und Bilobalid.

Um einen exakten Vergleich zwischen Referenz- und Testpräparat gewährleisten zu können, mußten die pharmakokinetischen Parameter vor der statistischen Auswertung dosisnormiert werden. Beide Formulierungen enthielten ähnlich viel an Ginkgolid A, B und Bilobalide, was zuvor quantifiziert wurde (s. Tab. 25). Demnach werden die oben beobachteten Unterschiede nach Dosiskorrektur noch deutlicher (denn das Testprodukt enthält von allen relevanten Inhaltsstoffen zwischen 6 und 30 % mehr und zeigt trotzdem geringere Plasmaspiegel).

**Tab. 25.:** Gehalte in mg pro Formulierung an relevanten Inhaltsstoffen des Referenz- und Testproduktes

<b>Gehalt in mg pro Formulierung</b>		
	<b>Referenzprodukt</b>	<b>Testprodukt</b>
<b>Ginkgolid A</b>	0,81 ± 0,03	1,07 ± 0,02
<b>Ginkgolid B</b>	0,41 ± 0,08	0,50 ± 0,01
<b>Bilobalid</b>	1,89 ± 0,09	2,01 ± 0,02

Im Falle der Probanden Nr. 11 und 12 konnten keine Plasmakonzentrationen für Ginkgolid B detektiert werden, weshalb die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter fehlt. Eine statistische Berechnung wurde daher nur für die Probanden Nr. 1 - 10 durchgeführt.

Die statistische Auswertung zeigt bei der Berechnung der 90 %-Konfidenzintervalle für  $AUC_{0-\infty}$  und  $C_{max}$  bezogen auf alle drei Substanzen enge Bereiche. Trotzdem liegt keines dieser Intervalle im Bioäquivalenzbereich von 80 - 125 % für  $AUC_{0-\infty}$  bzw. von 70 - 143 % für  $C_{max}$ . Ginkgolid A weist einen Punktschätzer und ein Konfidenzintervall von 53 % / 49,46 - 55,25 % für  $AUC_{0-\infty}$  und von 32 % / 27,61 - 36,18 % für  $C_{max}$  auf. Für Ginkgolid B waren es 26 % / 19,09 - 35,94 % für  $AUC_{0-\infty}$  und 13 % / 12,68 - 17,87 % für  $C_{max}$ . Kleinere Unterschiede ergaben sich für das Referenz- und Test-Präparat bezüglich Bilobalid: Punktschätzer und Konfidenzintervall für  $AUC_{0-\infty}$  lagen bei 83 % / 77,59 - 88,08 % und für  $C_{max}$  bei 57 % / 49,23 - 65,38 %.

---

Durch Abschätzung der Konfidenzintervalle konnte deutlich gezeigt werden, daß Bioäquivalenz zwischen den Präparaten nicht besteht und deutliche Unterschiede existieren.

### **3.5 Zusammenfassung wichtiger Ergebnisse des Test- und Referenzproduktes der Bioverfügbarkeitsstudie**

Tabelle 26 vergleicht die Gehalte an Flavonglykosiden und Terpenlaktone der beiden in der Bioverfügbarkeitsstudie eingesetzten Fertigprodukte mit der Spezifikation der Kommission E-Monographie, welche für die amerikanischen Nahrungsergänzungsmittel keine Gültigkeit besitzt, aber auf die durch amerikanische Fertigprodukte oft indirekt über EGb 761 Bezug genommen wird. Es zeigt sich, daß das Testprodukt hinsichtlich aller pharmakologisch relevanter Inhaltsstoffe oberhalb dieser Spezifikation liegt. Der im Testprodukt enthaltene Extrakt kann deshalb nicht als pharmazeutisch äquivalent zum Extrakt des Referenzproduktes gelten, welcher diese Anforderungen erfüllt.

Tabelle 27 stellt neben den Gehalten pharmakologisch wichtiger Inhaltsstoffe (Ginkgolid A, B und Bilobalid) in mg pro Formulierung, die Freisetzungsdaten der beiden Produkte anhand dieser drei Inhaltsstoffe zum Zeitpunkt 30 min und deren pharmakokinetischen Parameter aus der Bioverfügbarkeitsstudie dar.

Es wird deutlich, daß die absolut enthaltene Menge wirksamkeits(mit)bestimmender Substanzen nicht ausschließlich die *in vivo*-Situation bedingt; das Testprodukt, welches höhere Gehalte an wirksamkeitsmitbestimmenden Komponenten aufweist, zeigt wesentlich geringere Plasmaspiegel dieser Substanzen. Der Einfluß der Arzneistoff-Formulierung wird folglich durch die *in vitro*-Freisetzungsbefreiung und die *in vivo*-Bioverfügbarkeitsstudie evident. Neben der Qualität der enthaltenen Extrakte ist bei Ginkgo biloba-haltigen Fertigpräparaten folglich auch der Einfluß der Darreichungsform zu berücksichtigen.

**Tab. 26:** Vergleich der Gehalte mit der vorgegebenen Spezifikation der Kommission E-Monographie

	<b>Centrum Herbals: Ginkgo biloba (Testprodukt)</b>	<b>Nature's Way: Ginkgold (Referenzprodukt)</b>																								
<b>Flavonglykosid-Gehalt bezüglich Extrakt</b>	Spezifikation der Kommission E-Monographie: 22 – 27 % 32,17	25,13																								
<b>Terpenlaktongehalt bezüglich Extrakt</b>	Spezifikation der Kommission E-Monographie: 5 – 7 % Terpenlaktone, davon 2,8 – 3,4 % Ginkgolide A, B und C und 2,6 – 3,2 % Bilobalid																									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>GkA</th> <th>GkB</th> <th>GkC</th> <th>GkA, B und C</th> <th>Bilobalid</th> <th>Gesamt-Terpenlaktone</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1,78</td> <td>0,83</td> <td>2,02</td> <td>4,63</td> <td>3,35</td> <td>7,98</td> </tr> </tbody> </table>	GkA	GkB	GkC	GkA, B und C	Bilobalid	Gesamt-Terpenlaktone	1,78	0,83	2,02	4,63	3,35	7,98	<table border="1"> <thead> <tr> <th>GkA</th> <th>GkB</th> <th>GkC</th> <th>GkA, B und C</th> <th>Bilobalid</th> <th>Gesamt-Terpenlaktone</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1,35</td> <td>0,68</td> <td>1,3</td> <td>3,33</td> <td>3,15</td> <td>6,48</td> </tr> </tbody> </table>	GkA	GkB	GkC	GkA, B und C	Bilobalid	Gesamt-Terpenlaktone	1,35	0,68	1,3	3,33	3,15	6,48
GkA	GkB	GkC	GkA, B und C	Bilobalid	Gesamt-Terpenlaktone																					
1,78	0,83	2,02	4,63	3,35	7,98																					
GkA	GkB	GkC	GkA, B und C	Bilobalid	Gesamt-Terpenlaktone																					
1,35	0,68	1,3	3,33	3,15	6,48																					

**Tab. 27:** Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung zweier Präparate

Relevante Inhaltsstoffe	Centrum Herbals: Ginkgo biloba (Testprodukt)			Nature's Way: Ginkgold (Referenzprodukt)		
	Ginkgolid A	Ginkgolid B	Bilobalid	Ginkgolid A	Ginkgolid B	Bilobalid
<b>Gehalte in mg pro Formulierung</b>	1,07 ± 0,02	0,50 ± 0,01	2,01 ± 0,02	0,81 ± 0,03	0,41 ± 0,08	1,89 ± 0,09
<b>In vitro-Freisetzung nach 30 min bei</b>						
pH 1	12,9 ± 1,1	13,2 ± 1,6	14,2 ± 2,0	100,9 ± 1,3	99,0 ± 0,6	101,2 ± 1,7
pH 4.5	11,5 ± 2,3	4,5 ± 0,3	17,8 ± 1,5	99,7 ± 1,7	99,5 ± 2,0	99,6 ± 1,7
<b>Pharmakokinetische Parameter (arithh. Mittel):</b>						
$C_{max}$	9,43 ± 2,80	1,31 ± 0,71	33,10 ± 10,10	22,20 ± 4,57	8,27 ± 1,82	54,40 ± 13,60
$t_{max}$	2,21 ± 0,66	2,21 ± 1,21	2,08 ± 0,63	1,17 ± 0,39	1,54 ± 0,50	1,21 ± 0,45
$t_{1/2}$	4,99 ± 0,90	9,91 ± 6,02	3,52 ± 0,73	3,93 ± 0,40	6,04 ± 1,48	3,19 ± 0,40
$AUC_{tot}$	83,90 ± 19,40	18,90 ± 12,40	192,00 ± 43,60	121,00 ± 22,90	59,90 ± 11,40	217,00 ± 44,10

## 4 Diskussion

In den USA werden pflanzliche Präparate häufig als Nahrungsergänzungsmittel auf den Markt gebracht. Dementsprechend finden bei diesen Produkten die für Arzneimittel gültigen sehr umfassenden Anforderungen an die Dokumentation der pharmazeutischen Qualität, sowie an den Beleg der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit keine Anwendung. Angesichts der Fülle der Präparate, der zunehmenden Marktbedeutung und der Anwendung bei definierten Indikationen stellt sich die Frage, ob im Sinne des Patienten eine ausreichende Qualität der Produkte deren Einsatz rechtfertigt. Daß es relevante Unterschiede in den pharmazeutischen Qualitäten von Phytopharmaka gibt, wird beispielsweise auch durch eine Untersuchung zur Chargenkonformität von Johanniskraut-Präparaten gestützt, die zeigt, daß viele, aber eben nicht alle untersuchten Produkte, eine reproduzierbare Chargenkonformität bezüglich Hyperforin und Hypericin zeigen (Wurglics *et al.*, 2001).

Die Anwendung des Ginkgo biloba-Extraktes bei definierten Indikationen beruht auf klinischen Studien, die mit einzelnen EGb 761 enthaltenden Präparaten umfassend erforschter und reproduzierbarer Qualität durchgeführt worden sind, die den Einsatz bei den postulierten Indikationen nach Auffassung europäischer Behörden rechtfertigen. Durch die Kommission E-Monographien werden ausschließlich Anforderungen an den Extrakt bzw. Wirkstoff gestellt. Das Erfüllen der durch die Monographie geforderten Spezifikation läßt noch keine Aussage über die Qualität der daraus gefertigten Präparate bzw. deren Vergleichbarkeit mit anderen Produkten zu. Folglich ist eine Bezugnahme durch andere Extrakt- bzw. Präparatehersteller auf klinische Studien, die mit EGb 761 enthaltenden Fertigprodukten durchgeführt worden sind, und den sich daraus ergebenden Indikationen wissenschaftlich nur gerechtfertigt, wenn erstens die Extrakte die gleiche pharmazeutische Qualität besitzen und zweitens auch Bioäquivalenz gezeigt wurde.

Wie Vergleichbarkeit von Arzneimitteln, insbesondere von Phytopharmaka, offiziell und nach aktuellem wissenschaftlichen Stand definiert ist und welche Kriterien dafür herangezogen werden, beschreibt Absatz 4.1. In Absatz 4.2 werden anschließend die Ergebnisse anhand der vorgestellten Kriterien diskutiert.

---

## 4.1 Kriterien zur Vergleichbarkeit von Phytopharmaka

Da rationale Phytopharmaka wie chemisch-synthetische Arzneimittel auch einen Indikationsanspruch erheben, müssen sie auch die gleichen Kriterien erfüllen. Für chemisch-synthetische Wirkstoffe wurde die Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence (London, 14 Dezember 2000) erarbeitet, die unter anderem die folgenden Begriffe definiert.

- **Pharmazeutische Äquivalenz**

Arzneimittel sind pharmazeutisch äquivalent, wenn sie gleiche Mengen gleicher Wirkstoffe in vergleichbaren Darreichungsformen enthalten, welche den gleichen oder vergleichbaren Standards entsprechen. Pharmazeutische Äquivalenz ist nicht zwangsläufig gleichzusetzen mit Bioäquivalenz, da eine unterschiedliche technologische Formulierung Unterschiede in der Freisetzung und/oder der Absorption nach sich ziehen kann.

- **Bioäquivalenz**

Zwei Arzneimittel sind bioäquivalent, wenn sie pharmazeutisch äquivalent sind und wenn ihre Bioverfügbarkeiten bei Gabe gleicher Dosen so ähnlich sind, daß die erzielten Effekte bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit praktisch identisch sind. Präparate sind in der Therapie gegeneinander austauschbar, wenn deren Bioäquivalenz gegeben ist. Zur Überprüfung der Bioäquivalenz von Phytopharmaka müßte der gesamte Extrakt und keine Einzelkomponenten herangezogen werden, da der Wirkstoff bei pflanzlichen Arzneimitteln der gesamte Extrakt ist.

Als Alternativen zu den klassischen Untersuchungen, in denen pharmakokinetische Messungen durchgeführt werden, um Bioäquivalenz zu zeigen, können andere Studien durchgeführt werden, bei denen die Bioverfügbarkeit mit klinischen oder pharmakodynamischen Endpunkten charakterisiert werden. Auch Studien an Tiermodellen oder in vitro-Studien sind grundsätzlich möglich, wenn sie entsprechend validiert sind.

---

- **Essential Similarity**

Beansprucht ein Produkt die gleichen biopharmazeutischen Eigenschaften wie ein Vergleichsprodukt, so muß Essential Similarity nachgewiesen werden. Die gültige Richtlinie in der EU (Europäischen Union) definiert „essentially similar products“ folgendermaßen (s. „The rules governing medicinal products in the European Union“, Notice to Applicants, Vol. 2A in accordance with the December 1998 European Court of Justice ruling in the „Generics“ case):

Ein Arzneimittel kann verglichen mit einem anderen Produkt als „essential similar“ angesehen werden, wenn es die gleichen qualitativen und quantitativen Zusammensetzung hinsichtlich der aktiven Komponenten aufweist. Ferner müssen beiden Präparate in der gleichen Darreichungsform vorliegen, und es muß u.U. Bioäquivalenz nachgewiesen sein.

Essential Similarity ist eines der wichtigsten Kriterien, wenn sich ein Produkt auf die Daten eines anderen Produktes beziehen möchte. Neuerdings wird bei schnell freisetzenden Produkten das Konzept der „Essential Similarity“ auch für andere vergleichbare orale Darreichungsformen, z.B. Tabletten und Kapseln, erweitert.

Ein „essentially similar product“ kann anstelle des Referenz-Produktes verwendet werden. Ein Referenz-Produkt ist üblicherweise ein Arzneimittel, welches aufgrund eines umfassenden Dossiers einschließlich chemischer, biologischer, pharmazeutischer, pharmakologisch-toxikologischer und klinischer Daten zugelassen und vermarktet wird.

Aufgrund der Besonderheiten der Phytopharmaka erweist sich eine direkte Übertragbarkeit der geforderten Kriterien als schwierig. Diese Besonderheiten verlangen die Definition akzeptabler Kriterien für die vergleichende Bewertung der pharmazeutischen Qualität analog zusammengesetzter Extrakte bezüglich Chargen- und Produktkonformität.

Zur Herstellung von Phytopharmaka mit konstanter Qualität sollte neben der Verwendung der gleichen Ausgangsdroge, desselben Herstellungsverfahrens und desselben Lösungsmittels und unter Berücksichtigung des gleichen DEV, eine Normierung oder Standardisierung stattfinden.

---

Normierung nennt man das Einstellen auf einen definierten Gehalt eines wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffs bzw. Inhaltsstoffgruppe mit Hilfsstoffen oder durch das Mischen von Extraktchargen der gleichen Drogen mit abweichendem Gehalt. In der Regel wird mit Hilfsstoffen/Stellmitteln gearbeitet.

Standardisierung umfassen alle Maßnahmen während der Herstellung, die zu einer reproduzierbaren Qualität führen. Standardisiert wird entweder auf pharmakologisch relevante Stoffe oder auf Leitsubstanzen durch Mischen unterschiedlicher Drogenpartien oder unterschiedlicher Chargen der Zubereitungen. Problematisch daran ist, daß man zum Standardisieren Leitsubstanzen verwendet, deren Relevanz für den therapeutischen Effekt zunächst nicht bekannt ist, so daß die Gefahr der Über- und Unterbewertung des Standardisierungsparameters besteht.

Die *Herbal Medicinal Products Working Group (HMPWG)* umschreibt in ihrem Vorschlag *Draft Points to Consider on the Evidence of Safety and Efficacy Required for Well-established Herbal Medicinal Products in Bibliographic Applications* (EMA/HMPWG/23/99 draft) vom Januar 1999 Essential Similarity folgendermaßen:

Als Wirkstoffe in Phytopharmaka eingesetzte pflanzliche Extrakte können dann als ausreichend ähnlich betrachtet werden, wenn die Spezifikation identisch ist und wenn keine relevanten Unterschiede in den Herstellungsprozessen existieren.

#### **4.1.1 *In vitro*-Freisetzung von Phytopharmaka**

Als biopharmazeutische Qualität bezeichnet man die *in vitro*-Freisetzung, welche als Teil der pharmazeutischen Qualität gilt.

Voraussetzung für den therapeutischen Effekt systemisch wirksamer Arzneimittel ist die in ihrer Quantität ausreichende und hinsichtlich der Geschwindigkeit angemessene Bioverfügbarkeit der wirksamen Bestandteile. In diesem Zusammenhang spielen die biopharmazeutischen Eigenschaften der Darreichungsform, d.h. ihre pharmazeutische Qualität, die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Darreichungsform und daraus resultierend die Bioverfügbarkeit nach Applikation bei festen oralen Zubereitungen eine entscheidende Rolle. Vor diesem Hintergrund müssen als unabdingbare Voraussetzung für die Zulassung

---

von Fertigarzneimitteln nach dem Arzneimittelgesetz (AMG 1976) nicht nur deren Wirksamkeit und Unbedenklichkeit, sondern auch die ordnungsgemäße pharmazeutische Qualität belegt sein. Aus diesem Grund kommt der Charakterisierung der biopharmazeutischen Eigenschaften bei systemischen Arzneimitteln eine wesentliche Bedeutung zu. Dies gilt grundsätzlich nicht nur für chemisch definierte synthetische Präparate, sondern auch für Produkte pflanzlichen Ursprungs, sofern die bei der Zulassung für das Produkt reklamierte Indikation die systemische Verfügbarkeit der pflanzlichen Bestandteile erfordert (Schug *et al.*, 1999).

Durch eine Reihe von Zwischenfällen, mit zum Teil tödlichen Ausgang, in den 60iger und 70iger Jahren, zeigte sich die Relevanz der biopharmazeutischen Qualität, und umfangreiche Untersuchungen zum Thema „Was sind Arzneimittel mit problematischer Bioverfügbarkeit?“ wurden begonnen (Blume, 1987). Allgemeine Definitionen und Richtlinien zum Thema der Bioverfügbarkeit und Bioäquivalenz folgten (CPMP-guideline „Untersuchung über Bioverfügbarkeit und Bioäquivalenz“ III/54/89).

Die Untersuchung der biopharmazeutischen Eigenschaften einer Arzneiform kann in Abhängigkeit von der Zielsetzung (Produktentwicklung, Qualitätskontrolle) und den jeweiligen Rahmenbedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgen. Die gezielte und systematische Verknüpfung von *in vitro*-Freisetzungsuntersuchungen und biopharmazeutisch ausgerichteten *in vivo*-Studien stellt ein geeignetes Instrumentarium zur Erarbeitung von *in vitro*- / *in vivo*-Korrelationen dar, anhand derer mittels *in vitro*-Prüfungen erfaßte Unterschiede im Freisetzungsverhalten hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Situation *in vivo* eingeschätzt werden können (Schug *et al.*, 1999). Ob die *in vitro*-Freisetzungsdaten prädiktiven Charakter für die *in vivo*-Daten haben, hängt davon ab, durch welchen Parameter die Bioverfügbarkeit (Ausmaß und Geschwindigkeit) primär bestimmt wird (Amidon *et al.*, 1995).

#### **4.1.2 Bioverfügbarkeitsuntersuchungen an Phytopharmaka**

Studien zur Bioverfügbarkeit oraler Arzneimittel mit systemischer Wirksamkeit werden mit unterschiedlichen Intentionen durchgeführt:

Einerseits wird eine Charakterisierung der biopharmazeutischen Eigenschaften der Darreichungsform angestrebt, d.h., die Untersuchungen konzentrieren sich auf den Einfluß

---

der Arzneiform auf Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption des enthaltenen Pharmakons. Dabei ist die entscheidende Frage, welcher Teilprozeß den insgesamt geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Nur wenn dies die Freisetzung eines Wirkstoffs aus der Darreichungsform ist, kommt den galenischen Eigenschaften des Arzneimittels für den Gesamtprozeß entscheidende Bedeutung zu. Wird dagegen die Aufnahme in den Organismus durch den Permeationsprozeß durch die Darmmembran „kontrolliert“, so sind gewisse Veränderungen der Wirkstofffreisetzung aus der Darreichungsform ohne Belang. In diesem Fall würde die Bioverfügbarkeit des Arzneimittels nicht von der Qualität der pharmazeutischen Form abhängen, sondern nur von den pharmakokinetischen Stoffeigenschaften (Permeabilität).

Andererseits werden Bioverfügbarkeitsprüfungen auch mit dem Ziel durchgeführt, die Plasmakonzentration-Zeit-Profile als Surrogatparameter für Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zu bestimmen. Entscheidende Voraussetzung für Bioverfügbarkeitsstudien ist natürlich, daß der analysierte Arzneistoff für die erwünschten Wirkungen, aber auch die unerwünschten Effekte, Bedeutung besitzt. Nur wenn hier ein direkter Zusammenhang besteht, kann aus den aktuellen Konzentrationen auf die klinische Wirkung extrapoliert werden (Blume, 1999).

#### **4.1.3 Alternativen der Plasmakonzentrationsbestimmungen zur Charakterisierung der Bioverfügbarkeit von Phytopharmaka**

Angesichts der komplexen Zusammensetzung der Phytopharmaka ist die Identifizierung der wirksamkeitsbestimmenden oder –mitbestimmenden Komponenten besonders wichtig. Nur wenn diese bekannt sind, macht eine Bioverfügbarkeitsuntersuchung über Analyse einzelner Bestandteile in Körperflüssigkeiten einen Sinn. Vor diesem Hintergrund muß bei pflanzlichen Arzneimitteln mit unbekanntem Wirkprinzip nach geeigneten Alternativen gesucht werden. In diesem Zusammenhang werden in letzter Zeit z.B. pharmakodynamische Ansätze diskutiert. Durch die Bestimmung pharmakodynamischer Parameter soll dabei die Aufnahme und Ausscheidung des gesamten „wirksamen Prinzips“ des pflanzlichen Arzneimittels in den Organismus verfolgt werden. Voraussetzung hierfür ist natürlich, daß der untersuchte Effekt graduell quantifizierbar ist, in seiner Ausprägung eine Beschreibung von Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption erlaubt und vor allem mit der klinischen Wirksamkeit des betreffenden Arzneimittels korreliert (Blume, 1999).

---

- **Pharmakodynamische Ansätze für Ginkgo biloba**

Für Ginkgo biloba-Extrakt sind wirksamkeitsmitbestimmende Komponenten bekannt, so daß eine partielle Untersuchung der Bioverfügbarkeit durch Analyse dieser Bestandteile im Blut möglich ist. Es wäre nützlich, einen pharmakodynamischen Ansatz als Surrogatparameter für die Wirksamkeit zu haben, der wirksamkeitsbestimmende Komponenten erfaßt, unabhängig davon, ob diese identifiziert sind oder nicht.

Ein Beispiel eines pharmakodynamischen Ansatzes zeigt der Nachweis der Bioverfügbarkeit von EGb 761-enthaltenden Präparaten im Gehirn anhand des Phamako-Elektro-Encephalogramms (EEGs). Stoffe, die im Gehirn eine pharmakodynamische Wirkung entfalten, beeinflussen in charakteristischer Weise die Hirnstromkurven. EGb 761-enthaltende Produkte zeigen ein nootropisches Profil, welches durch Verbesserung der Vigilanz und einiger kognitiver Fähigkeiten charakterisiert werden kann (Luthringer *et al*, 1995). Von spezifischen Effekten kann man ausgehen, wenn sie statistisch sicher von Placeboeffekten unterscheidbar und reproduzierbar sind und wenn sie eine Dosisabhängigkeit zeigen.

In einer doppelblinden, plazebokontrollierten Studie im Cross-over-Design an gesunden jungen Probanden konnte durch Itil und Mitarbeiter (Itil *et al*, 1996) gezeigt werden, daß die Gabe von EGb 761-enthaltenden Fertigarzneimitteln (40 mg, 120 mg und 240 mg) eindeutig die EEG-Profile konzentrationsabhängig und spezifisch veränderte, und die EEG-Profile des Ginkgo biloba-haltigen Produktes mit typischen EEG-Profilen kognitiv aktivierender Substanzen korrelierte. Außerdem konnten auch qualitative Unterschiede verschiedener auf dem US-Markt befindlicher Ginkgopräparate aufgedeckt werden (Itil & Martorano, 1995). Mit Hilfe des EEG kann die zerebrale Bioverfügbarkeit von ZNS-aktiven Wirkstoffen nachgewiesen werden. Dabei gibt das EEG zusätzlich Hinweise auf die psychopharmakologische Wirkstoffklasse. Das EEG ermöglicht ferner die Unterscheidung verschiedener Pflanzenextrakte hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe.

Die Bioverfügbarkeit von rheologisch wichtigen Inhaltsstoffen des EGb 761 nach peroraler Applikation konnte durch Effekte an Erythrozyten (Verformbarkeit) durch Artmann *et al*. (Artmann *et al*, 1991) in einem *ex vivo*-Bioassay nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe etablierte einen Bioassay, mit dessen Hilfe man die antioxidative Kapazität verschiedener,

---

auch komplex zusammengesetzter Stoffgemische an Erythrozyten testen kann. Diese Methode bietet den Vorteil, in lebenden, organischen Strukturen messen zu können – auf einer Ebene, die über der molekularen, aber unter der tierexperimentellen Ebene liegt. Sie basiert auf der Messung der veränderten Lichtstreuung nach Verformung roter Blutzellen durch chemische oder mechanische Einflüsse (Artmann & Schikarski, 1900). Die Etablierung der photometrischen Messung von Erythrozyten-Veränderungen wird ausführlich beschrieben von Artmann et al. beschrieben (Artmann *et al.*, 1996).

Die beiden vorgestellten Ansätze für pharmakodynamische Modelle können nur als Surrogat für einen Teil der Wirksamkeit von Ginkgo biloba-Extrakt gelten: der eine untersucht ZNS-Effekte bzw. Effekte des Ginkgo biloba auf das EEG und der andere antioxidative Effekte an peripheren Zellen (Erythrozyten). Ginkgo biloba zeigt sowohl zentral als auch peripher sehr viele verschiedene Effekte, die sich wahrscheinlich nicht in Gesamtheit an einem Modell abbilden lassen werden.

#### **4.1.4 Biopharmazeutische Klassifizierung**

Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption nach peroraler Applikation werden, wie bereits erwähnt, vorrangig durch zwei voneinander unabhängige Prozesse bestimmt: die Auflösung des Arzneistoffes und damit die Freisetzung aus der Arzneiform sowie die Permeation durch die Darmmukosa. Daraus resultiert, daß für die Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels die biopharmazeutischen Eigenschaften der Darreichungsform nur dann relevant sein können, wenn die Freisetzung aus der Tablette den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Ist hingegen die Permeation durch die Darmmembran der für die Geschwindigkeit der Resorption entscheidende Prozeß, so wird die Aufnahme in den Organismus in hohem Maße unabhängig von den Charakteristika der Arzneiform und in erster Linie durch die Eigenschaften des enthaltenen Arzneistoffs geprägt.

Im Zusammenhang mit diesen Betrachtungen kommt den physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften zentrale Bedeutung zu, und dabei stehen vor allem die Löslichkeit (in wässrigen Puffern mit physiologischen pH-Werten) und die Permeabilität (durch Lipidmembranen) im Vordergrund der Betrachtung. Die Löslichkeit bestimmt in gewissen Grenzen die Freisetzung aus der Arzneiform. Dies ist auch der Grund dafür, daß besonders bei Arzneistoffen mit relativ schlechter Löslichkeit durch geeignete galenische Maßnahmen

für eine ausreichend rasche und quantitative Wirkstofffreisetzung gesorgt werden muß. Die Tatsache, daß Bioverfügbarkeitsprobleme immer wieder bei vor allem schlecht löslichen Arzneistoffen aufgefunden wurden (z.B. Glibenclamid, Nifedipin, Carbamazepin, Ciclosporin), verdeutlicht diesen Zusammenhang.

Die Membranpermeabilität ist für die Aufnahme der Pharmaka aus dem Magen-Darm-Trakt in den Organismus von entscheidender Bedeutung. Nur wenn diese aus praktisch allen Darmabschnitten rasch und weitgehend quantitativ erfolgt, ist nicht mit einer relevanten Beeinträchtigung der Bioverfügbarkeit zu rechnen.

Angesichts der Bedeutung dieser beiden Stoffcharakteristika wurde im Rahmen des Biopharmaceutics Classification System (BCS) eine Klassifizierung der Arzneistoffe vorgenommen, die in vier Gruppen aufgegliedert werden (Tab. 28).

**Tab. 28:** Biopharmazeutische Klassifizierung von Arzneistoffen nach Löslichkeit und Permeabilität

Arzneistoffklassifizierung	Löslichkeit	Permeabilität
Klasse 1	gut	gut
Klasse 2	schlecht	gut
Klasse 3	gut	schlecht
Klasse 4	schlecht	schlecht

In diesem Zusammenhang stellt sich natürlich die Frage, ob und inwieweit das BCS auf pflanzliche Arzneimittel übertragen werden kann. In eher seltenen Fällen, in denen die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen im einzelnen bekannt sind, sollte eine sinngemäße Anwendung ohne relevante Modifizierung der Systematik möglich sein. Wie auch bei den chemisch definierten Arzneistoffen müßten die Wirksubstanzen isoliert und entsprechend hinsichtlich ihrer Löslichkeit und Permeabilität charakterisiert werden. Auch bei den Freisetzungsprüfungen kann die Dissolution unmittelbar anhand der wirksamkeitsbestimmenden Stoffe verfolgt werden. Bei der überwiegenden Zahl der pflanzlichen Arzneimittel stellt sich die Situation jedoch ungleich schwieriger dar, da die wirksamkeitsbestimmenden Bestandteile nicht vollständig bekannt sind und somit auch nicht biopharmazeutisch charakterisiert werden können – weder hinsichtlich ihrer Löslichkeit noch hinsichtlich ihrer Permeabilität. Zur Zeit wird davon ausgegangen, daß sich bei vielen Phytopharmaka das Wirkprofil auch in Zukunft nicht einzelnen Bestandteilen isoliert zuordnen lassen wird. Vielmehr wird bei diesen Phytopharmaka der gesamte enthaltene

---

Extrakt als der Arzneistoff verstanden. Meist handelt es sich bei den pflanzlichen Extrakten um Vielstoffgemische, die Komponenten mit sehr unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften enthalten. Angesichts der Tatsache, daß sich in diesen Fällen kein klarer Zusammenhang der zu erwartenden Wirkung mit einzelnen Bestandteilen des Extraktes aufstellen läßt, macht das Heranziehen sogenannter „Leitsubstanzen“ für die Charakterisierung der Bioverfügbarkeit keinen Sinn, da die so erhobenen Daten keine Schlüsse auf die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Arzneimittels zulassen. Auch für die biopharmazeutische Charakterisierung ist das Heranziehen von Leitsubstanzen ungeeignet, da möglicherweise die für die Wirksamkeit (und Unbedenklichkeit) relevanten Extraktbestandteile grundsätzlich andere physiko-chemische Eigenschaften aufweisen und somit in ihrer Freisetzung aus der Darreichungsform gänzlich anderen Einflüssen unterliegen.

Angesichts dieser Problematik würde nur die Charakterisierung der Auflösung des Gesamtextraktes aus der Darreichungsform einen sinnvollen Ansatz darstellen. Für die Realisierung würde dies bedeuten, daß repräsentativ über das gesamte Spektrum der Extraktbestandteile einzelne Substanzen ausgewählt werden müßten, deren Freisetzung dann in entsprechend angelegten Untersuchungen charakterisiert wird. Hintergrund dieses Konzeptes ist die Überlegung, daß die Charakterisierung der gesamten Bandbreite der Extraktbestandteile (orientiert an den physiko-chemischen Eigenschaften) die Annahme erlaubt, daß die innerhalb dieses Spektrums liegenden, und möglicherweise für die Wirksamkeit relevanten Bestandteile nicht grundsätzlich in ihrem Verhalten von den so untersuchten Stoffen abweichen (Schug *et al*, 1999).

Es stellt sich die Frage, ob und wann *in vivo*-Bioverfügbarkeitsstudien mit Phytopharmaka, deren Wirksamkeit an eine systemische Verfügbarkeit der Bestandteile geknüpft ist, eventuell verzichtbar sind. Solange die Aufnahme des Wirkstoffes in den Organismus durch die biopharmazeutischen Eigenschaften der Arzneiform geprägt wird, sind *in vivo*-Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit grundsätzlich nicht verzichtbar, da sie ein essentielles Bindeglied zwischen der Qualität des Arzneimittels und seiner Wirksamkeit darstellen. Hängt die Bioverfügbarkeit jedoch primär nicht von den Eigenschaften der jeweiligen Darreichungsform ab, sondern von den Stoffeigenschaften der enthaltenen Wirksubstanzen, so spielen vor allem die Löslichkeit und Permeabilität der Stoffe durch biologische Membranen, und damit das BCS, eine entscheidende Rolle.

Bei gut löslichen Arzneistoffen geht man davon aus, daß sie – verarbeitet in ausreichend schnell ( $> 80\%$  / 30 min) freisetzenden Zubereitungen – sich *in vivo* wie orale Lösungen verhalten. Bei diesen wiederum sind per se keine Bioverfügbarkeitsprobleme zu erwarten, weil die Resorption hier nicht durch die galenischen Eigenschaften beeinflußt wird, sondern in erster Linie von der Geschwindigkeit der Magenpassage abhängt. Innerhalb der Gruppe der gut löslichen Arzneistoffe kann davon ausgegangen werden, daß wiederum die Substanzen mit schlechter Permeabilität (Klasse III des BCS) besonders unproblematisch hinsichtlich der Bioverfügbarkeit sind. Bei ihnen wird nämlich die Aufnahme in den Organismus nicht durch die Freisetzung aus der Darreichungsform, also durch die biopharmazeutischen Eigenschaften des Produktes, bestimmt, sondern von der Permeation durch die Darmmembran „kontrolliert“.

Schlechte Löslichkeit von Arzneistoffen bedingt häufig eine verzögerte Freisetzung aus den mit diesen Stoffen hergestellten festen oralen Präparationen, die oftmals zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Damit kann die schlechte Löslichkeit des Arzneistoffes Ursache für eine kritische Bioverfügbarkeit solcher Zubereitungen sein.

Ein Verzicht auf *in vivo*-Studien wäre also dann gerechtfertigt, wenn gezeigt werden kann, daß die wirksamkeitsbestimmenden oder –mitbestimmenden Bestandteile des betreffenden Phytopharmakons „gut“ wasserlöslich sind und aus der festen oralen Darreichungsform „schnell“ freigesetzt werden.

## **4.2 Bewertung der qualitativen und quantitativen Produktunterschiede hinsichtlich der Kriterien für Vergleichbarkeit von Phytopharmaka**

### **4.2.1 Pharmazeutische Qualität**

Die Ergebnisse zur Untersuchung der pharmazeutischen Qualität, wie z. B. die Fingerprint-Untersuchung oder die Gehaltsbestimmungen wirksamkeitsmitbestimmender Inhaltsstoffe, zeigen deutlich, daß es Unterschiede in den Extraktzusammensetzungen (Qualitäten) und Quantitäten bestimmter Inhaltsstoffe gibt. Es wurden offensichtlich Extrakte eingesetzt, die nicht nach vergleichbaren Herstellungsprozessen (DEV, Extraktionsmittel, Extraktionsprozeß etc.) gewonnen wurden, wie man den Fingerprint-Chromatogrammen entnehmen kann. Sie bilden den Extrakt in seiner komplexen Zusammensetzung von hydrophilen bis zu lipophilen Inhaltsstoffen ab und geben auch einen klaren Eindruck von qualitativen und quantitativen

---

Unterschieden, die durch die gewählten Extraktionsparameter determiniert sind. Die Extrakte unterscheiden sich sowohl qualitativ (Begleitstoffmuster) als auch quantitativ gravierend voneinander.

Vergleicht man die Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen mit der Spezifikation, die von der Kommission E vorgegeben wird, so zeigt sich, daß einige Produkte diese [Flavonglykoside 22 – 27 %; Terpenlaktone 5 – 7 % (Bilobalid 2,6 – 3,2 %; Summe Ginkgolid A, B und C 2,8 – 3,4 %) und < 5 ppm Ginkgolsäure] nicht erfüllen: 80 % der untersuchten Chargen entsprachen aufgrund zu hoher Ginkgolsäure-Gehalte (s. Ergebnisse, Tab. 7) nicht, 65 % entsprachen aufgrund zu niedriger oder zu hoher Terpenlaktone-Gehalte und etwa 50 % aufgrund zu hoher Flavonglykosid-Gehalte nicht. Bewertet man die Ergebnisse von in den USA auf dem Markt befindlichen Ginkgo biloba-Präparaten hinsichtlich der pharmazeutischen Äquivalenz, so müßte die Forderung nach gleichen Mengen gleicher Wirkstoffe, also gleiche Mengen eines in seiner Spezifikation entsprechenden Extraktes, erfüllt sein. Wie oben erwähnt wurde als Maßstab die Spezifikation, wie sie in der von der Kommission E aus EGb 761 abgeleiteten Monographie Ginkgo-biloba-Trockenextrakt angegeben ist, angelegt. Die wenigsten Produkte entsprachen dieser vorgegebenen Spezifikation und konnten deshalb nicht als pharmazeutisch äquivalent zu EGb 761 (beispielsweise in Nature's Way Products: Ginkgold oder in Pharmaton: Ginkoba) bezeichnet werden.

Weder die in Europa gültigen Richtlinien bezüglich Essential Similarity noch die durch die Kommission E Monographie vorgegebene Spezifikation besitzen in den USA Gültigkeit. Allerdings sind auch dort Bewegungen im Gange, den Phytopharmaka-Markt transparenter zu gestalten und Vergleichbarkeit und Austauschbarkeit zu ermöglichen. Es gibt folglich auch in den USA eine klare Definition von „pharmazeutischer Äquivalenz“, die der in Europa („essential similarity“) bis auf das Kriterium der Bioäquivalenz entspricht. Dem Beispiel des europäischen Marktes folgend, Phytopharmaka in Form von Monographien zu reglementieren, befindet sich zur Zeit auch in den Vereinigten Staaten von Amerika eine Monographie für Ginkgo biloba-Extrakte in Bearbeitung, die nachfolgend kurz vorgestellt wird.

- **Entwurf einer amerikanischen Ginkgo biloba-Monographie**

Der Entwurf für die Monographie „Powdered Ginkgo Extract“ ist als In-Process Revision abgedruckt im Pharmacopeial Forum Vol. 26, No. 4, p. 1091 pp. (July - August 2000). Dieser hat sich offensichtlich stark orientiert an der Kommission E-Monographie „Ginkgo-biloba-Blätter, Trockenextrakt (35-67 : 1) extrahiert mit Aceton-Wasser; ASK.-Nr. 05939.

In der folgenden Tabelle (Tab. 29) ist die Spezifikation der Kommission-E-Monographie der des USA-Entwurfes gegenübergestellt. Gravierende Unterschiede zeigen sich in der Vorgabe für den Terpenlaktone-Gehalt, dessen Spanne die USP deutlich größer und höher wählt als die Kommission E. Damit ist die Spezifikation bezüglich aktiver Komponenten des Extraktes eine andere und eine Bezugnahme auf klinische Studien, welche mit Fertigprodukten, die den Vorgaben der Kommission E entsprechenden Ginkgo-Extrakt EGb 761 enthalten, wissenschaftlich nicht mehr gerechtfertigt.

**Tab. 29:** Vergleich der Extrakt-Spezifikation der Kommission E mit der der USP

<b>Spezifikationen</b>	<b>Kommission E</b>	<b>USP- Entwurf</b>
Ausgangsdroge	Ginkgo biloba-Blätter	dried and comminuted leaves of Ginkgo
DEV	35-67 : 1	35-67 : 1
Auszugsmittel	Aceton-Wasser	Acetone-water mixture or other suitable solvents
Flavonglykosid-Gehalt [%]	22 - 27	22 - 27
Terpenlaktone-Gehalt [%]	5 - 7	6 - 12
Bilobalid-Gehalt [%]	2,6 - 3,2	2,9 - 5,8
Ginkgolid A, B und C - Gehalt [%]	2,8 - 3,4	3,0 - 6,2 (inkl. Ginkgolid J)
Ginkgolsäure-Gehalt [ppm]	< 5	< 5

Auch die Forderungen des USP-Entwurfes werden von der Mehrzahl der untersuchten Produkte nicht erfüllt. Für Produkte mit Extrakten unterschiedlicher Spezifikation müssen eigene Belege hinsichtlich Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gefordert werden. Eine

---

Bezugnahme auf Studien, die mit Extrakten anderer Spezifikation durchgeführt wurden, ist nicht sinnvoll.

#### **4.2.2 Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf einen pharmakodynamischen Ansatz**

Wie bereits erwähnt, ist es möglich die Bioverfügbarkeit von Wirkstoffen / Extrakten alternativ - zur Bestimmung durch Analyse von Wirkstoffkonzentrationen im Plasma - über pharmakodynamische Parameter in einem Bioassay zu ermitteln. Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuche war es, einen geeigneten Ansatz für einen solchen pharmakodynamischen Parameter zu finden.

Aufgrund des vielfach postulierten Zusammenhangs zwischen oxidativem Streß und Apoptose und den antioxidativen / antiapoptotischen Eigenschaften des EGb 761 sollte ein Bioassay auf der Ebene der Apoptosemessung etabliert werden. Dieser pharmakodynamische Ansatz sollte sensitiv und quantifizierbar sein, um Unterschiede in Extraktzusammensetzungen zu detektieren und evtl. als Surrogatparameter für die Wirksamkeit zu dienen.

Eine *ex vivo*-Studie von Schindowski et al. konnte zeigen, daß eine perorale Applikation von EGb 761 an Mäusen (100 mg/kg Körpergewicht) über zwei Wochen die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte Apoptose an isolierten Lymphozyten zu reduzieren vermochte. Folglich erschienen Lymphozyten als ein geeignetes Modell, mit welchem man Arzneimittel-Effekte auf den Zelltod-Mechanismus beobachten könnte.

##### 4.2.2.1 Apoptose-Assays

Wie die Ergebnisse zeigen, haben die auf der Ebene von Apoptose-Assays (PI / 7-AAD) unter den gewählten Bedingungen durchgeführten Experimente keine Ansätze für einen Bioassay ergeben. Entweder konnten keine antiapoptotischen Effekte gezeigt werden, oder die Effekte waren nicht ausreichend groß bzw. nicht konzentrationsabhängig. Weshalb die in der Literatur beschriebenen antiapoptotischen Effekte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht reproduziert werden konnten, kann mehrere Gründe haben.

Zur Demonstration antiapoptotischer Eigenschaften von EGb 761 bzw. seiner Inhaltsstoffe sind verschiedenste Zellsysteme (nativ vs. Zelllinie, zentrale vs. periphere Zellen etc.) und

---

auch sehr unterschiedliche Apoptose-Induktoren (u.a. Serum-Entzug, Glutamat, Staurosporin, Wasserstoffperoxid) verwendet worden.

Zellen unterschiedlicher Herkunft reagieren unterschiedlich sensitiv gegenüber Apoptosestimuli und auch Zellprotektoren. Viele Experimente an nativen neuronalen Zellen unter Einsatz verschiedenster Apoptose-Induktoren belegen protektive Effekte durch EGb 761 bzw. Bilobalid (Ahlemeyer *et al*, 1999), (Ahlemeyer *et al*, 2001), (Xin *et al*, 2000). Auch an PC-12 Zellen wurden einige Experimente durchgeführt.

Die bisher publizierten Arbeiten zeigen die Vielfalt der experimentellen Ansätze. Doch nicht nur die verschiedenen Zellsysteme oder Apoptosestimuli haben Einfluß auf die Ergebnisse, sondern auch die unterschiedlichen Methoden der Apoptosedetektion: der Prozeß der Apoptose stellt eine Kaskade von Ereignissen dar, und die diversen Apoptose-Assays detektieren Ereignisse auf verschiedenen Stufen in dieser Kaskade. Beispielhaft sei hier die Messung von Veränderungen auf der Protein-/Enzym-Ebene (Caspase-Aktivitäten, Expression von Bcl-2, p53, c-Myc, Bax) als einem der früheren Ereignisse und die Messung von DNA-Bruchstücken als einem der späten Ereignisse im Prozeß der Apoptose genannt. Folglich sind die Ergebnisse von Assay zu Assay oft nicht miteinander vergleichbar.

Deshalb ist es durchaus nicht verwunderlich, daß in der Literatur beschriebene Apoptose-protektive Effekte aufgrund der Wahl anderer Versuchsbedingungen (Zellsystem, Apoptose-Stimuli, Apoptose-Assay, Inkubationszeiten, Ko- od. Präinkubation etc.) nicht reproduzierbar sind.

Problematisch bei der Interpretation bereits publizierter Daten ist, daß einige Arbeitsgruppen Apoptose-protektive Mechanismen untersucht haben, ohne den Nekroseanteil bzw. den Gesamtzelltod zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, können scheinbar Apoptose-protektive Effekte – bestimmt nach einer spezifisch Apoptose detektierenden Methode – auf dem Phänomen beruhen, daß vermehrt Zellen in Nekrose übergehen und damit der Apoptosemessung verlorengelangen. Möchte man zeigen, daß die zu untersuchende Substanz allgemein protektive Effekte für die Zelle hat, muß man den gesamten Zelltod erfassen, entweder differenziert nach Apoptose und Nekrose, wie z.B. mit 7-AAD, oder in einem nicht differenzierenden Assay (s. MTT).

---

#### 4.2.2.2 Viability-Messung mit Hilfe des MTT-Assays

Der MTT-Assay gilt als eine Methode, durch die Zytotoxizität bzw. Zell-protective Aktivität von Substanzen auf der Ebene des Gesamtzelltodes detektiert werden kann; sowohl Apoptose als auch Nekrose werden – undifferenziert - erfaßt. Welches Ereignis der MTT-Assay dabei tatsächlich umschreibt, wird derzeit noch diskutiert.

##### 4.2.2.2.1 Eigene Daten des MTT-Assays im Kontext mit publizierten Daten

Aus eigenen Untersuchungen von PC12-Zellen auf zellprotective Effekte durch EGb 761 bei gleichzeitiger Inkubation mit  $\beta$ -Amyloid A $\beta_{25-35}$ , ergab sich auf der Ebene des MTT-Assays ein möglicher Ansatz für einen Bioassay: EGb 761 zeigte konzentrationsabhängig im Bereich von 10 – 500  $\mu\text{g/ml}$  nach Koinkubation mit A $\beta$  1  $\mu\text{M}$  für 24 h protective Effekte. Um abschätzen zu können, worin der antagonistische Effekt des EGb 761 gegenüber A $\beta$  begründet sein könnte, muß man sich mit der Wirkung des  $\beta$ -Amyloids auf Zellen auseinandersetzen.

- A $\beta$ -Effekte an PC12-Zellen

$\beta$ -Amyloid, ein hydrophobes Peptid aus meist 40 Aminosäuren, entsteht aus einem viel größeren Protein, dem Amyloid-Präkursor-Protein (APP). A $\beta$  spielt in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung eine bedeutende Rolle: extrazelluläre Aggregate aus  $\beta$ -Amyloid bilden mit anderen Bestandteilen zusammen senile Plaques, in deren Umgebung es vermehrt zu oxidativem Streß, lokalen Entzündungsreaktionen und Degeneration von Neuronen kommt.

Eine Arbeitsgruppe um Zhou et al. (Zhou & Zhu, 2000) konnte zeigen, daß, wenn PC12-Zellen gleichzeitig mit ROS (ausgelöst durch Xanthin/Xanthin-Oxidase) und Bilobalid (25-100  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, eine Reduktion der Apoptosrate erreicht werden konnte (gemessen durch TUNEL-Methode, elektrophoretische Analyse der DNA-Fragmentation, Durchflußzytometrie/PI, durchflußzytometrische Messung einiger pro- und antiapoptotischer Proteine c-Myc, p53, Bcl-2, Bcl-x und Bax, RT-PCR und Caspase-Assay).

Auch durch A $\beta_{25-35}$  (100  $\mu\text{M}$ ) ausgelöste Zytotoxizität konnte durch Bilobalid (25 – 100  $\mu\text{M}$ ) an PC12-Zellen gehemmt werden (gemessen mit Hilfe MTT, LDH, Lipidperoxidation TBARS, Aktivität antioxidativer Enzyme) (Zhou *et al*, 2000). Ergebnisse von Yao et al. (Yao

*et al.*, 2001) ergaben protektive Effekte durch EGb 761 ( $> 30 \mu\text{g/ml}$ ) an PC12-Zellen nach zytotoxischer Behandlung mit aggregiertem  $\text{A}\beta_{1-40}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) im MTT-Assay. Koinkubation für 24 Stunden schützte vor der Generierung freier Radikale, Apoptose und Nekrose, wohingegen Vor- und Nachbehandlung der Zellen mit EGb 761 nur vor ROS-Bildung, aber nicht gegen Apoptose und Zelltod schützen konnte. Die Autoren vermuteten, daß die Inhibition der durch  $\beta$ -Amyloid induzierten MTT-Effekte auf direkter Interaktion des  $\beta$ -Amyloids mit EGb 761 beruhen könnte. Tatsächlich haben *in vitro*-Studien demonstriert, daß EGb 761 in konzentrationsabhängiger Weise die Bildung von ADDLs ( $\beta$ -amyloid-derived diffusible neurotoxic soluble ligands) hemmt, welche vermutlich in die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung involviert sind. Außerdem konnten sie zeigen, daß die Terpenlaktone- und Flavonoid-freie Fraktion des EGb 761 Extraktes nicht vor  $\text{A}\beta$  induziertem Zelltod zu schützen vermag. Diese Befunde deuten darauf hin, daß die Eigenschaften der Flavonglykoside und/oder Terpenlaktone – unabhängig der antioxidativen Potenz - allein oder zusammen mit anderen Komponenten des EGb 761 für die protektiven Effekte gegenüber  $\text{A}\beta$  verantwortlich sind. Dennoch spielen auch die antioxidativen Eigenschaften des EGb 761 bzw. der Flavonoide eine wichtige Rolle in der Protektion gegenüber  $\text{A}\beta$  induzierter Toxizität und Zelltod (Bastianetto *et al.*, 2000a).

Diese Befunde haben zu intensiven Forschungen über die neurotoxische Potenz von  $\beta$ -Amyloid geführt; zahlreiche Wirkungen auf Zellen und Gewebe sind beschrieben worden. Einige Zellarten, wie z.B. Gliazellen und Astrozyten, reagieren nicht sensitiv gegenüber  $\beta$ -Amyloid. In der quantitativen Beurteilung der toxischen Potenz von  $\beta$ -Amyloid variieren die Literaturangaben gravierend. Eine Ursache dafür liegt wohl in der wenig einheitlichen Definition des Begriffes Toxizität. Während einige Autoren die toxischen Effekte des  $\text{A}\beta$  anhand definierter und objektivierbarer Kriterien wie dem Untergang der Zellmembranintegrität (Trypanblau-Ausschluß, Fluoreszenzfarbstoffe, LDH-Freisetzung) beurteilen, bewerten andere die  $\text{A}\beta$ -Toxizität ausschließlich auf der Basis morphologischer Veränderungen. Ein weiterer Parameter, der die Variationen in der Potenz der  $\text{A}\beta$ -Toxizität verursachen könnte, ist der Aggregationszustand des Peptides. In wässrigem Milieu aggregiert  $\beta$ -Amyloid spontan und wird erst dadurch zu einem toxischen Agens.

Die Diskrepanz zwischen der in zwei verschiedenen Zytotoxizitätsassays gemessenen  $\text{A}\beta$ -Effekte, und damit der unterschiedlichen quantitativen Beurteilung der  $\text{A}\beta$ -Toxizität, wurde auch in Experimenten unserer Arbeitsgruppe deutlich. Unter der Behandlung von PC12-

---

Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  A $\beta_{25-35}$  über 24 Stunden konnte eine Hemmung des MTT-Effektes auf 40 % bezogen auf die unbehandelte Kontrolle ausgelöst werden. Wie aus Untersuchungen von Leutz (Leutz 2001) hervorgeht, sind die in diesen Experimenten an PC 12-Zellen eingesetzten Konzentration an A $\beta$  (1 $\mu\text{M}$ ) nach Messungen im LDH-Assay (LDH-Aktivität / -Freisetzung) nicht zelltoxisch. Diese Unterschiede in den gemessenen Toxizitäten im MTT- und LDH-Assay, die nicht auf verschiedene Aggregationszustände des eingesetzten A $\beta$  zurückzuführen sind, beschreiben auch andere Arbeiten (Abe & Kimura, 1996); (Kato *et al*, 1997); (MacGibbon *et al*, 1997); (Shearman *et al*, 1994); (Patel *et al*, 1996).

Eine mögliche Erklärung, daß der MTT-Assay und LDH-Assay bezüglich der Toxizitätsuntersuchung keine kongruenten Ergebnisse liefern, obwohl beide Methoden als Viability-Assays gelten, wäre, daß sie zeitlich verschiedene Ereignisse in der Zelltod-Kaskade detektieren. Dafür spricht die Theorie der mitochondrialen Dysfunktion: Shearman *et al*. beurteilten die Hemmung der MTT-Reduktion bei fehlender LDH-Freisetzung als eine Störung des Energiestoffwechsels (mitochondriale Atmungskette), die ein frühes Ereignis in der apoptotischen Zelltod-Kaskade darstellt (Shearman *et al*, 1994). Die LDH-Freisetzung ist ein spätes Ereignis in der Zelltod-Kaskade.

Eine andere mögliche Erklärung ist, daß der MTT-Assay im Falle niedriger Konzentrationen A $\beta_{25-35}$  (1  $\mu\text{M}$  über 24h) Ereignisse erfaßt, die nichts mit der Zelltodkaskade zu tun haben und damit auch konsekutiv nicht zum Zelltod führen und deshalb nicht im LDH-Assay zu detektieren sind.

Trotz breiter Verwendung des MTT-Assays ist der exakte Mechanismus der MTT-Umsetzung nicht bekannt. Als gesichert gilt, daß mitochondriale Atmungsketten-Enzyme an der Reduktion des MTT-Substrates beteiligt sind, z.B. die Succinatdehydrogenase (Slater, Sawyer, *et al*. 1963). Demnach bedeutet die Reduktion des MTT-Effektes durch ein zytotoxisches Agens eine mehr oder weniger spezifische Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskette. Allerdings partizipieren auch extramitochondriale NADH- und NADPH-abhängige Redoxenzyme an der MTT-Reduktion (Berridge & Tan, 1993a). Eine Inhibition der Atmungsketten-Enzyme führt zu einer unvollständigen Hemmung der MTT-Umsetzung, was die exklusive Umsetzung des MTT in der mitochondrialen Atmungskette negiert (Hawtin *et al*, 1995).

Neben der Theorie der mitochondrialen Dysfunktion durch A $\beta$  als einem frühen Ereignis der Zelltod-Kaskade, gibt es eine andere plausible Hypothese bezüglich der beobachteten Hemmung der MTT-Reduktion durch A $\beta$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle: sie geht von experimentellen Befunden aus, die zeigen, daß die weitere Umsetzung von MTT-Reagenz unterbrochen wird, sobald das MTT-Formazan in kristalliner Form extrazellulär abgelagert wird (Liu *et al.*, 1997).  $\beta$ -Amyloid erhöht die Exozytosegeschwindigkeit, u.a. an hippokampalen Neuronen (Abe & Saito, 1998). MTT-Formazan wird durch Exozytose aus der Zelle transportiert, die Formazankristalle lagern sich auf der Zellmembran ab und folglich könnte die Nachlieferung und damit die Umsetzung des MTT-Reagenzes behindert werden. Das bedeutet, je schneller die Exozytose des MTT-Formazans aus der Zelle heraus erfolgt, desto eher versiegt die Nachlieferung des MTT-Reagenzes.

Daß A $\beta$  auch an PC12-Zellen die Exozytose-Geschwindigkeit erhöht und das beschleunigte Auftreten von MTT-Formazankristallen von Bedeutung ist, zeigt die vergleichende Untersuchung der Abhängigkeit von der Dauer der MTT-Inkubation an unbehandelten, mit A $\beta$  und/oder EGb 761 [250 $\mu$ g/ml] behandelten PC12-Zellen. Die Effekte wurden jeweils photometrisch quantifiziert und die MTT-Reduktion fotografisch dokumentiert. Das Ergebnis war, daß A $\beta_{25-35}$  (1 $\mu$ M für 24 Stunden) die MTT-Absorption signifikant (auf 40 % bezüglich unbehandelter Kontrolle) senken, und Ginkgo biloba-Extrakt EGb 761 diese Hemmung der MTT-Umsetzung teilweise antagonisieren konnte.

Es stellt sich die Frage, welcher Mechanismus der durch A $\beta$  bedingten Beschleunigung der Exozytose zugrunde liegt. Effekte des  $\beta$ -Amyloid auf der Ebene der Zellmembran sind bekannt. A $\beta$  erhöhte die Anisotropie der Zellmembran in Ganzhirnhomogenaten der Ratte (Muller *et al.*, 1995) und auch die von PC12-Zellen (Leutz 2001). Die Anisotropie ist ein Maß für die Fluidität von Membranen: erhöhte Anisotropie bedeutet verminderte Membranfluidität und umgekehrt, d.h., daß A $\beta$ -Behandlung zu einer verringerten Membranfluidität führt. Auch andere Arbeitsgruppen postulieren eine Interaktion von  $\beta$ -Amyloid mit der Plasmamembran und bezeichnen diese Interaktion als ein initiales Ereignis in der A $\beta$ -induzierten Zellschädigung. Zusätzlich sprechen Befunde für diese Hypothese, die zeigen, daß A $\beta$  in artifiziellen und biologischen Membranen interkaliert und deren strukturellen Aufbau stört (Terzi *et al.*, 1994) (Terzi *et al.*, 1997). Insbesondere die für die neurotoxische Aktivität von  $\beta$ -Amyloid verantwortliche Teilsequenz A $\beta_{25-35}$  ist im hydrophoben Kern der Membran lokalisiert (Mason *et al.*, 1996).

---

Unspezifische Störungen der Membranstruktur und –funktion führen wahrscheinlich sekundär zur Modulation zahlreicher biologischer Parameter, wie z.B. der zellulären Homöostase, und damit eventuell sogar bis zum Zelltod.

Auf welchem Wege, EGb 761 die Effekte von A $\beta$  auf PC12-Zellen partiell zu antagonisieren vermag, ist offen. Möglicherweise interagiert EGb 761 direkt mit der Zellmembran, also auf der gleichen strukturellen Ebene wie A $\beta$ , und inhibiert so die durch A $\beta$  bewirkte Steigerung der Exozytosegeschwindigkeit. Andererseits könnte EGb 761 aber auch indirekt in Prozesse der A $\beta$ -induzierten Modulation der Membraneigenschaften, welche eine vermehrte Exozytose ermöglicht hatte, eingreifen.

- Bewertung des MTT-Assays als potentieller Ansatz für einen Bioassay

#### *PC 12-Zellen*

In bezug auf die Frage, ob sich der MTT-Assay an PC12-Zellen als pharmakodynamischer Ansatz im Sinne eines Bioassays eignen würde, muß man sich noch einmal die Kriterien für einen Bioassay vor Augen führen.

Voraussetzung ist, daß der untersuchte Effekt graduell quantifizierbar ist und mit der klinischen Wirksamkeit des betreffenden Arzneimittels korreliert. Wenn ein Bioassay nicht nur ein Surrogat-Parameter für klinische Wirksamkeit des **Wirkstoffes** sein soll, sondern zusätzlich als Alternative zu Bioverfügbarkeitsstudien gelten soll, muß er auch in seiner Ausprägung eine Beschreibung von Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption erlauben und damit zusätzlich den Einfluß der pharmazeutischen Formulierung erfassen.

Die Quantifizierbarkeit des MTT-Effektes ergibt sich aus dessen Konzentrationsabhängigkeit. Es konnte eine Konzentrationsabhängigkeit vom EGb 761 im höheren  $\mu\text{g/ml}$  Bereich gezeigt werden. Daß dieser Assay allerdings nicht sensitiv genug ist, um kleine Unterschiede in Extrakten abbilden zu können, zeigt der Vergleich mit *in vivo* gemessenen Wirkstoffkonzentrationen, welche im unteren bis mittleren  $\text{ng/ml}$  Bereich liegen. In diesem Bereich ist der Assay nicht sensitiv.

Des weiteren stellt sich die Frage, ob der Effekt im MTT-Assay durch EGb 761 etwas mit der klinischen Wirksamkeit zu tun hat. Solange nicht feststeht, welcher Parameter in der

---

A $\beta$ -vermittelten Toxizität bestimmt wird und ob dieser überhaupt mit Zelltod-Effekten in Zusammenhang steht, kann dieser Assay nicht als Surrogat für die Wirksamkeit gelten.

Aus Gründen der Übertragbarkeit des Bioassays auf physiologische Bedingungen und damit der Relevanz der *in vitro*-Ergebnisse für die *in vivo*-Situation sollten diese Befunde von PC12-Zellen auf ein Modell übertragen werden, das mit physiologischen Zellen arbeitet, in diesem Fall humanen Lymphozyten.

#### *Humane Lymphozyten (PBMC)*

Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, daß sich  $\beta$ -Amyloid zur Induktion von MTT-Effekten an humanen Lymphozyten nicht eignet. Deshalb wurden mit Cholesterin zytotoxische Effekte induziert, die leider durch verschiedene Konzentrationen EGb 761 (10 – 500  $\mu$ g/ml) nicht inhibiert werden konnten.

Das bedeutet, daß der einzige Ansatz, der sich eventuell als pharmakodynamisches Modell hätte entwickeln können, sich nicht auf Lymphozyten übertragen ließ. Ohne diesen Transfer auf Lymphozyten fehlt ein wichtiges Kriterium eines Bioassays: nämlich die Messung des Effektes, die eine Beschreibung von Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption erlaubt.

#### 4.2.2.3 Bewertung der *in vitro* eingesetzten Konzentrationen an Ginkgo biloba

Zu diskutieren bleibt, ob

- a) die *in vitro* verwendeten Konzentrationen in einem Bereich eingesetzt wurden, der sich für vergleichbare *in vitro*-Experimente erfahrungsgemäß als effektiv und geeignet erwiesen hat
- b) die in *in vivo/ex vivo*-Tierstudien eingesetzten Konzentrationen mit den für die Therapie am Menschen empfohlenen Tagesdosen übereinstimmen und
- c) die *in vitro* verwendeten Konzentrationen mit in humanen *in vivo*-Studien gemessenen Plasmaspiegeln zu vergleichen sind.

zu a) Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Konzentrationen verwendet wie sie für vergleichbare *in vitro*-Experimente in der Literatur beschrieben sind.

zu b) Wie Tabelle 30 zu entnehmen ist, werden viele *in vivo*- und *ex vivo*-Tierstudien an Nagermodellen (Ratte, Maus etc.) durchgeführt. In diesen ist oftmals eine Konzentration von

---

100 mg EGb 761 / kg Körpergewicht des Nagers per os pro Tag effektiv. Diese Dosis entspräche - umgerechnet in eine Tagesdosis für einen 80 kg schweren Menschen - in etwa 8 g EGb 761. Therapeutisch verwendet werden Tagesdosen bis zu 240 mg EGb 761. Dies entspricht in etwa einer 33fach geringeren Dosierung als bei *in vivo* / *ex vivo*-Nagermodellen. Diese Diskrepanz ist eventuell durch Unterschiede der Bioverfügbarkeiten, Stoffwechselwege etc. im Nager und Menschen zu erklären.

zu c) Beim Vergleich von *in vivo*- und *in vitro*-verwendeten Konzentrationen ist zu berücksichtigen, daß die jeweils vorliegenden Bedingungen sehr unterschiedlich sind. Bei *in vitro*-Versuchsansätzen handelt es sich um einzelne Zellen, Zellverbände und Organe, die losgelöst und unabhängig von ihrer physiologischen Umgebung und deren Einflüssen vorliegen. So gibt es *in vitro* keine bzw. eine geringere Beeinflussung der eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen (z.B. Bioverfügbarkeit oder Einflüsse durch Stoffwechselforgänge) verglichen mit *in vivo*-Bedingungen.

In Zellkultur-Assays wurde EGb 761-Extrakt im mittleren und oberen µg/ml Bereich eingesetzt. Die ermittelten maximalen Plasma-Konzentrationen aus der Bioverfügbarkeitsstudie lagen in ng/ml Bereich für Ginkgolid A ( $C_{\max}$  22 ng/ml), B ( $C_{\max}$  8 ng/ml) und Bilobalid ( $C_{\max}$  55 ng/ml). Geht man von einer *in vitro*-verwendeten EGb 761-Konzentration von 100 µg/ml und einem Bilobalid-Gehalt im EGb 761-Extrakt von 2,6 – 3,2 % aus, entspricht diese Bilobalid-Konzentration (2600 – 3200 ng/ml) etwa einer 50fach höheren Konzentration als der *in vivo* gefundenen Plasmakonzentration (55 ng/ml).

Die in Apoptose-Assays gefundenen zytotoxischen Effekte der extrem hohen Konzentrationen an EGb 761 und Fraktion 5 (500 µg/ml) bzw. Quercetindihydrat (100 µM) (s. Kapitel 3.3) lassen sich vermutlich aufgrund der *in vitro* vielfach höher eingesetzten Konzentrationen als die, die *in vivo* gemessen wurden, als physiologisch irrelevant bewerten.

Letztendlich ist die große Diskrepanz zwischen den *in vitro*- versus *in vivo*-Studien verwendeten Konzentrationen und im Menschen gemessenen Plasmaspiegeln nicht hinreichend geklärt.

**Tab. 30:** Übersicht von *in vivo* und *ex vivo* verwendeter Konzentrationen an Ginkgo biloba und seiner Inhaltsstoffe

Arbeitsgruppe	Tiermodell	Studie	Dosis	Ergebnis
(Etienne <i>et al.</i> , 1985)	Ratte	In vivo	EGb 761 100 – 200 mg/kg p.o.; BN 52021 (GkB) 2,5 mg/kg i.v. oder 5-10 mg/kg p.o.	PAF-Antagonismus: Senkung der Todesrate induziert durch Endotoxin
(Pietri <i>et al.</i> , 1997)	Ratte	In vivo	EGb 761 60 mg/kg p.o. 15 d ; GkA: 4 mg/kg p.o.	Antischämische, antioxidative und kardioprotektive Effekte: Verbesserung hämodynamischer Parameter
(Ramassamy <i>et al.</i> , 1992)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 akut 100 mg/kg p.o.; semi-chronisch 2 x 100 mg/kg p.o. 4 d	Steigerung der synaptosomalen Aufnahme von 5-HT
(Amri <i>et al.</i> , 1996)	Ratten	In vivo	EGb 761 10-100 mg/kg p.o. 8 d; Bilobalid 4 mg/kg p.o. 8 d; GkA + GkB 2 mg/kg i.p. 8 d	Neuroprotektive und Antistress-Effekte: adrenale PBR mRNA, Protein und Ligand-Bindung sinkt, daraus resultiert ein verminderter Glukocortikoid-Spiegel im Serum; Bilobalid zeigt keinen Effekt
(Amri <i>et al.</i> , 1997)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 100 mg/kg p.o. 8 d; GkB 2 mg/kg i.p. 8 d	Hemmung der ACTH-induzierten adrenalen Steroidgenese (PBR reguliert die Hormon-gesteuerte Steroidgenese)
(Bourgain <i>et al.</i> , 1986)	Meerschweinchen	In vivo	BN 52021 4 mg/kg i.v. oder 10 <sup>-4</sup> M lokal	Antithrombotischer Effekt: Hemmung der PAF-induzierten Thrombusbildung
(Karcher <i>et al.</i> , 1984)	Ratten	In vivo	EGb 761 100 mg/kg i.p. akut oder 200 mg/kg p.o. 14 d	Antihypoxische Eigenschaften: Verlängerung der Überlebenszeit nach hypobarer Hypoxie (Energie-Metabolismus im Gehirn wird beeinflusst: Glukose-Spiegel steigt; Zusammenbruch des Energie-Metabolismus wird verhindert)

Arbeitsgruppe	Tiermodell	Studie	Dosis	Ergebnis
(Klein <i>et al.</i> , 1997)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 200 mg/kg p.o.; Bilobalid 6 – 20 mg/kg akut	Antihypoxische Eigenschaften: Inhibition der Hypoxie-induzierten, PLA <sub>2</sub> -abhängigen Freisetzung von Cholin aus hippokampalen Phospholipiden
(Belougne <i>et al.</i> , 1996)	Ratten	In vivo	EGb 761 50 + 100 mg/kg p.o. 10 d	Antithrombotischer Effekt: Laser-induzierte Thrombose wird vermindert (weniger Emboli und geringere Dauer der Embolisation) vergleichbar mit Aspirin-Effekt
(Kim <i>et al.</i> , 1998)	Ratten / Mäuse	In vivo	Kombination von Ticlopidin und EGb 761 20 + 40 mg/kg p.o. 5 d	Plättchenaggregationshemmung und antithrombotischer Effekt: Kombination gegenüber Ticlopidin allein überlegen
(Bruno <i>et al.</i> , 1993)	Ratten	In vivo	Bilobalid 10 mg/kg i.p. 6 d	Regeneration von Motor-Nerven beschleunigt
(Tosaki <i>et al.</i> , 1996)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 25 + 50 mg/kg p.o. 10 d	Antischämische Eigenschaften: Verbesserung der Herzfunktion nach Ischämie
(al-Zuhair <i>et al.</i> , 1998)	Ratten	Ex vivo	Kombination von Meclofenoxat und EGb 761 150 mg/kg p.o. 4 Wo.	Antioxidative und Anti-Aging Effekte: Kumulation oxidativer Schädigungen im Alter wird vermindert
(Winter & Timineri, 1999)	Ratten	In vivo	EGb 761 10 mg/kg i.p.	Fördert Entseidungsfähigkeit
(Pierre <i>et al.</i> , 1999)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 100 mg/kg p.o. 10 d	Antischämische und antioxidative Eigenschaften: Hemmung ischämischer Schäden wie verminderte Na-K-ATPase-Aktivität und Lipidperoxidation
(Soybir <i>et al.</i> , 1999)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 4 mg/kg p.o. 2d	Freie-Radikalfänger-Eigenschaft und PAF-Antagonismus: Verbesserung von Cerulein-induzierter akuter Pankreatitis

Arbeitsgruppe	Tiermodell	Studie	Dosis	Ergebnis
(Wu & Zhu, 1999)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 20-100 mg/kg i.p. 7 d; GkA + B 5-50 mg/kg i.p. 7 d	Neuroprotektive und neurorestorative Effekte: Verringerung der MPTP-induzierten Neurotoxizität; Gk A + B nicht effektiv
(Ozenirler <i>et al.</i> , 1997)	Ratte	Ex vivo	EGb 761 200 mg/kg p.o. 10 d	Antioxidative Eigenschaften: Hemmung der CCl <sub>4</sub> -induzierten Leberschädigung (Malondialdehyd-Bildung sinkt durch EGb 761)
(Brochet <i>et al.</i> , 1999)	Mäuse	In vivo	EGb 761 25 + 50 mg/ml i.p. akut; GkB 1 mg/kg i.p.; GkA ineffektiv; Bilobalid 2 + 5 mg/kg i.p.	Vigilanz-verbessernde und antidepressive Effekte: Inhibition der Barbitol-induzierten Narkose (evtl. Involvierung GABA-gesteuerter Chloridkanäle im ZNS)
(Varga <i>et al.</i> , 1999)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 25-100 mg/kg p.o. 10 d	Antischämische und kardioprotektive Effekte: Verbesserung postschämischer Herzfunktionen (NO-Fänger und Inhibition der iNOS-Expression)
(Shen <i>et al.</i> , 1998)	Ratten	In vivo	EGb 761 25-200 mg/kg i.p. akut	Kardioprotektive Effekte nach Ischämie/Reperfusion: Inhibition der Bildung Thiobarbitursäure-ähnlicher Verbindungen, der Freisetzung von Kreatinkinase + NO und der Inzidenz von ventrikulären Arrhythmien
(Barkats <i>et al.</i> , 1995)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 50 mg/kg p.o. 7 Mo.	Neuroprotektive und neurotrophe Eigenschaften: altersbedingte Veränderungen hippocampaler Regionen werden verhindert

Arbeitsgruppe	Tiermodell	Studie	Dosis	Ergebnis
(Tighilet & Lacour, 1995)	Katzen	In vivo	EGb 761 25-50 mg/kg i.p.; EGb 761 40-80 mg/kg p.o. während der Heilung	Verbesserung der Neuroplastizität: beschleunigte Regeneration des Gleichgewichtsorgans
(Brailowsky & Montiel, 1997)	Ratten	In vivo	EGb 761 10 mg/kg i.p. 7 d	Verbesserung der Motor-Funktion bei halbseitiger Lähmung
(Sasaki <i>et al.</i> , 1999)	Mäuse	Ex vivo	Bilobalid 30 mg/kg p.o. 4 d	Antikonvulsive Eigenschaften: GABA-Spiegel und Glutaminsäure-Decarboxylase-Aktivität und -Protein im Gehirn erhöht
(Sastre <i>et al.</i> , 1998)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 100 mg/kg p.o. 3 Mo.	Antioxidative und Anti-Aging Effekte: mitochondriales Altern wird verhindert durch antioxidative Eigenschaften
(Winter, 1998)	Ratten	In vivo	EGb 761 50 mg/kg p.o. chronisch 24 Mo. und akut	Chronisch: Verlängerung der Überlebenszeit; akut: verbessertes kognitives Verhalten
(Kriegelstein <i>et al.</i> , 1995)	Mäuse / Ratten	Ex vivo	EGb 761, GkA 50 mg/kg s.c., GkB 100 mg/kg s.c. und Bilobalid 5-20 mg/kg s.c. akut	Neuroprotektive Effekte: Infarktgröße nach Ischämie nimmt ab
(Sharma <i>et al.</i> , 1999)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 50 mg/kg p.o. 5 d	Antioxidative Eigenschaften: Hitzestress-induzierte Schäden nehmen ab (hochregulierte nNOS-Expression nimmt ab, Blut-Hirn-Schranken-Zusammenbruch, Hirnödem und Zellschädigungen werden verhindert)

Arbeitsgruppe	Tiermodell	Studie	Dosis	Ergebnis
(Trovero <i>et al.</i> , 1999)	Ratten	In vivo	EGb 761 50+100 mg/kg p.o. 24 d	Effekte auf die Regulation der Corticosterone (EGb 761 senkt die Glucocorticoid-Spiegel über die Streß-aktivierten, hippocampalen Corticoid-Rezeptoren II)
(Hoyer <i>et al.</i> , 1999)	Ratten	In vivo	EGb 761 50 mg d	Verbesserung des Energiemetabolismus und des Verhaltens (Defizite im Lernen, Gedächtnis und Kognition) in geschädigten Neuronen
(Kurtsoy <i>et al.</i> , 2000)	Hunde	In vivo	EGb 761 100 mg/kg i.v. 4 d	Antioxidative Eigenschaften: Verhinderung von durch subarachnoidale Blutungen induzierten zerebralen Gefäßspasmen und -erkrankungen
(Wirth <i>et al.</i> , 2000)	Ratten	In vivo	EGb 761 30/60 mg/kg i.p. 30 d oder akut 60/120 mg/kg i.p.	Kurzzeitgedächtnis-Verbesserung
Pardon <i>et al.</i> 2000	Mäuse	ex vivo	EGb 761 50 mg/kg p.o. 7 Mo.	Antistress-Effekte: Reduktion der MAO-Aktivität im Gehirn durch EGb 761 (MAO hat Sauerstoff als Kofaktor und ist deshalb oxidationsempfindlich) (Radikalfängereigenschaften)
(Umegaki <i>et al.</i> , 2000)	Ratten	ex vivo	EGb 761 2 % in der Diät 20 d	Antihypertensiver Effekt: Erhalt der NO-abhängigen Vasorelaxation (Radikalfängereigenschaften) (NO wird durch Superoxid-Anion inaktiviert)
(Porsolt <i>et al.</i> , 2000)	Mäuse	In vivo	EGb 761 25-100 mg/kg p.o. 5 d	Antistress-Effekte: nicht primär durch MAO-hemmende Wirkung
(Shih <i>et al.</i> , 2000)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 6 mg Einmalinjektion	Antiaggressive Effekte: 5-HT <sub>2A</sub> -Funktion wird herabgesetzt, evtl. durch Blockade der Rezeptoren

Arbeitsgruppe	Tiermodell	Studie	Dosis	Ergebnis
(Drieu <i>et al.</i> , 2000)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 50/100 mg/kg p.o. 10 d	Antioxidative Eigenschaften: signifikante Zunahme zirkulierender und zellulärer PUFAs (Verbesserung der Membranfluidität und der Antwort auf oxidative Schäden)
(Topp <i>et al.</i> , 2001)	Ratten	In vivo	EGb 761 20 mg/kg i.v. akut	Verminderung postschämischer Reperfusionsschäden in der Leber (verminderte Leukozytenaktivierung und verbesserte hepatische Mikrozirkulation)
(Clark <i>et al.</i> , 2001)	Mäuse	Ex vivo	EGb 761 50/100 mg/kg p.o. 7d	Antioxidative Effekte: bei transienter fokaler Ischämie Verringerung des Hirninfarkt-Volumens (höhere Dosis bewirkt verstärkt intrazerebrale Blutungen!)
(Lamour <i>et al.</i> , 1992)	Ratten	Ex vivo	EGb 761 150 mg/kg i.p. in drei getrennten Dosen; GkB 10 mg/kg i.p. akut	Glukoseverbrauch: Lokaler zerebraler Glukoseverbrauch wird durch EGb 761, nicht aber durch GkB gesenkt
(Spinnewyn, 1992)	Wüstenrennmaus	Ex vivo	EGb 761 30/60 mg/kg p.o. 14 d	Neuroprotektive Effekte: nach Ischämie erhöhtes Überleben von neuronalen Zellen
(Porsolt <i>et al.</i> , 1992)	Ratten	In vivo	EGb 761 50/100 mg/kg p.o. 5 d	Antistress-Effekte: EGb 761 vermindert den Einfluß von Streß (Verhaltensmodelle) auf eine Art und Weise, die nicht mit klassischer anxiolytischer oder antidepressiver Wirkung erklärt werden kann

#### 4.2.3 Bewertung der *in vitro*-Freisetzungsuntersuchungen (biopharmazeutische Qualität) und der *in vivo*-Bioverfügbarkeitsstudie

Die zuvor durchgeführten *in vitro*-Freisetzungsuntersuchungen haben gravierende Unterschiede in der (bio)pharmazeutischen Qualität der in den USA auf dem Markt befindlichen Produkte gezeigt. So wiesen einige Produkte eine extrem langsame Freisetzung der untersuchten Extraktbestandteile verglichen mit den EGb 761 enthaltenden Produkten der Firma Schwabe (beispielsweise Ginkgold oder Ginkoba) auf. Da es bislang keine validen Informationen zur *in vitro*- / *in vivo*-Korrelation bei Ginkgo-Präparaten gibt, ist die Relevanz dieser Unterschiede für die Anwendung am Menschen nicht ohne weiteres zu beurteilen.

Da die Etablierung eines pharmakodynamischen Parameters bzw. eines Bioassays nicht gelungen ist (s. 4.2.2), wurde alternativ eine vergleichende Bioverfügbarkeitsstudie im klassischen Sinne durch Analyse von Plasmadaten durchgeführt. Eines der langsam freisetzenden Präparate des US-amerikanischen Marktes (Ginkgo biloba von Centrum Herbals) wurde mit dem sehr umfassend untersuchten Produkt der Firma Schwabe (Ginkgold von Nature's Way) durch Messung der Plasmakonzentrationen an wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffen (Ginkgolid A, B und Bilobalid) verglichen.

Bioverfügbarkeit wird definiert als das relative Ausmaß der therapeutisch wirksamen Substanz (verabreichter Arzneistoff, aktiver Metabolit oder wirksame Form nach Verabreichung eines Pro-Pharmakons) und Geschwindigkeit, mit welcher die wirksame Form in die systemische Zirkulation (in das Blut) gelangt bzw. am Wirkort verfügbar wird. Da bei pflanzlichen Arzneimitteln der gesamte Extrakt als Wirkstoff gilt, müßten all seine wirksamkeitsrelevanten Inhaltsstoffen analysiert werden. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung und der häufigen Unkenntnis der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe können pflanzliche Arzneimittel normalerweise hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit nicht vollständig untersucht werden. Deshalb sind für die Charakterisierung der Darreichungsformen die drei Bestandteile des Ginkgo-Extraktes ausgewählt worden, von denen ein relevanter Beitrag zur klinischen Wirksamkeit angenommen wird: Ginkgolid A, B und Bilobalid.

Die Auswertung der *in vivo*-Studie hat gravierende Unterschiede in den Bioverfügbarkeiten hinsichtlich aller untersuchten Inhaltsstoffe des Testproduktes (langsam freisetzendes

---

Produkt) zu dem Referenzprodukt (schnell freisetzendes Produkt) aufgezeigt. Es konnte keine Bioäquivalenz der beiden Produkte gezeigt werden.

#### **4.2.4 Bewertung hinsichtlich des BCS-Systems: Einfluß der Arzneiform der untersuchten Ginkgo biloba Präparate auf die Bioverfügbarkeit**

Im Hinblick auf die Frage, welcher Schritt bei Ginkgo biloba-Extrakt haltigen Produkten bezüglich der Bioverfügbarkeit der geschwindigkeitsbestimmende ist (Auflösung der Arzneiform und Freisetzung des Arzneistoffes oder Permeation durch Darmmukosa), wurden die *in vivo*-Daten unter Berücksichtigung der *in vitro*-Daten analysiert.

Die *in vitro*-Freisetzungsprofile waren signifikant verschieden, so daß, unter der Prämisse, daß die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Arzneiform der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bioverfügbarkeit ist, gravierende Unterschiede in den Plasmakonzentration-Zeit-Verläufen zu erwarten waren. Diese Erwartungen wurden in der *in vivo*-Studie bestätigt: für Test- und Referenz-Produkt konnten anhand der entsprechenden pharmakokinetischen Parameter signifikant unterschiedliche Bioverfügbarkeiten und folglich Bioinäquivalenz gezeigt werden.

Wäre der Permeationsprozeß durch die Darmmembran der die Aufnahme in den Organismus bestimmende Schritt gewesen, so hätte man Plasmakonzentration-Zeit-Profile erwarten müssen, die für beide Produkte (Test und Referenz) einen ähnlichen Verlauf genommen hätten (kein Einfluß der galenischen Form).

Die Ergebnisse aus der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchung der beiden Präparate bestätigt die oben angenommenen Prämisse, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt hinsichtlich der Bioverfügbarkeit die Freisetzung des/der Wirkstoffe/-s aus der Darreichungsform ist und somit der galenischen Entwicklung des Arzneimittels für die Bioverfügbarkeit entscheidende Bedeutung zukommt. Bioverfügbarkeitsstudien sind in diesem Falle also nicht verzichtbar.

## 5 Zusammenfassung

Aufgrund der zunehmenden Marktbedeutung und der Fülle pflanzlicher Präparate in Europa und den USA stellte sich die Frage, ob - im Sinne des Patienten und rationaler Phytotherapie - eine ausreichende Qualität der Produkte deren Einsatz rechtfertigt.

Die Qualität pflanzlicher Produkte ist aufgrund der Besonderheit eines Vielstoff-Gemisches mit oftmals unbekanntem wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen schwer zu beurteilen. In Europa sind deshalb schon vor Jahren Bestrebungen angestellt worden, pflanzliche Produkte aufgrund von Monographien (Kommission E) zumindest in ihren Ausgangsdrogen und ihrer Extraktsspezifikation zu vereinheitlichen. Normierung und Standardisierung von Extrakten wurden gefordert.

Während der Diskussion über die Qualität der Extrakte (Normierung/Standardisierung) ist dabei ein wesentlicher Aspekt hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Qualität und Wirksamkeit von Fertigprodukten verloren gegangen: der Einfluß der Arzneistoff-Formulierung auf die *in vivo*-Situation. Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption des enthaltenen Pharmakons (Bioverfügbarkeit) können sowohl von den physiko-chemischen Stoffeigenschaften, wie Löslichkeit und Permeabilität, als auch von Eigenschaften der Darreichungsform abhängen. Entscheidend ist, welcher Prozeß für die Resorption in den Organismus der geschwindigkeitsbestimmende ist: die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Darreichungsform oder der Permeationsprozeß durch die Darmmembran. Ist letzterer der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so sind gewisse Veränderungen der Wirkstofffreisetzung ohne Belang.

Das Vergleichen von Extraktqualitäten (Wirkstoffen), wie es durch die Kommission E-Monographie vorgeschlagen wird, ist folglich nicht ausreichend. Einflüsse der Darreichungsform (biopharmazeutische Eigenschaften) sind zu berücksichtigen. Wie bei chemisch-synthetischen Wirkstoffen sollte therapeutische Vergleichbarkeit über Bioäquivalenz-Studien belegt werden. Als bioäquivalent gelten zwei Produkte, wenn sie pharmazeutisch äquivalent sind und wenn ihre Bioverfügbarkeiten bei Gabe gleicher Dosen so ähnlich sind, daß die erzielten Effekte bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit praktisch identisch sind.

---

Das Problem des Belegs der pharmazeutischen Äquivalenz (gleiche Mengen gleicher Wirkstoffe in gleicher oder ähnlicher Darreichungsform) bei pflanzlichen Produkten ergibt sich aus der Tatsache, daß sie sich phytochemisch als Vielkomponenten-Gemische nur schwer charakterisieren lassen. Wirksamkeitsbestimmende Substanzen sind häufig nicht bekannt. Die Kenntnis wirksamkeits**mit**bestimmender Komponenten ermöglicht nur einen partiellen Beleg der Äquivalenz, und pharmakologisch irrelevante Leitsubstanzen können höchstens Zwecken der Standardisierung dienen.

Vergleichende Bioverfügbarkeitsuntersuchungen im Sinne von Analysen einzelner Bestandteile in Körperflüssigkeiten sind nur möglich, wenn die wirksamkeitsbestimmenden Komponenten des pflanzlichen Produktes bekannt sind. Alternativ werden Bestimmungen der Bioverfügbarkeit im Form pharmakodynamischer Ansätze diskutiert. Durch die Bestimmung pharmakodynamischer Parameter soll dabei die Aufnahme und Ausscheidung des gesamten „wirksamen Prinzips“ des pflanzlichen Produktes in den Organismus verfolgt werden. Voraussetzung ist natürlich, daß der untersuchte Effekt graduell quantifizierbar ist, in seiner Ausprägung eine Beschreibung von Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption erlaubt und vor allem mit der klinischen Wirksamkeit des betreffenden Produktes korreliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ginkgo biloba-haltige Fertigprodukte des US-amerikanischen Marktes hinsichtlich ihrer therapeutischen Vergleichbarkeit untersucht. Für Ginkgo biloba-Extrakte sind wirksamkeits**mit**bestimmende Komponenten benannt worden: Flavonglykoside und Terpenlaktone. Anhand derer wurden Untersuchungen zur pharmazeutischen Qualität der Ginkgo-Präparate durchgeführt.

Hinsichtlich der Gehalte an Flavonglykosiden und Terpenlaktonen ergaben sich beachtliche Unterschiede. Als Maßstab wurde die Spezifikation der Kommission E angelegt; viele der untersuchten Extrakte lagen signifikant außerhalb der vorgegebenen Spannen, andere wiederum erfüllten diese Anforderungen. Auch die Begleitstoffmuster und -gehalte der diversen Extrakte unterschieden sich deutlich voneinander. Als Beispiel seien hier die Ginkgolsäure-Gehalte angeführt, deren Spanne von < 5 ppm bis 90.000 ppm reichte. Die untersuchten Extrakte konnten also schon aufgrund der Gehalte an wirksamkeits**mit**bestimmenden Inhaltsstoffen in der Mehrzahl nicht als miteinander pharmazeutisch äquivalent angesehen werden. Zusätzlich ergaben Untersuchungen zu

---

biopharmazeutischen Qualitäten (*in vitro*-Freisetungsverhalten) einiger Produkte deutliche Unterschiede.

Da auch für Ginkgo biloba-Extrakt nicht alle wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe bekannt sind, wäre es wünschenswert gewesen, die Produkte in einem pharmakodynamischen Ansatz hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeiten miteinander vergleichen zu können. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit kein *in vitro*-Modell gefunden werden, welches sich als sensitiv genug und als potentieller Bioassay geeignet erwiesen hätte. Deshalb wurde wenigstens eine vergleichende Bioverfügbarkeitsstudie zweier Präparate – im klassischen Sinne - durch Analyse einiger wirksamkeitsmitbestimmender Substanzen (Ginkgolid A, B und Bilobalid) in Körperflüssigkeiten (Blut) durchgeführt. Zwei Produkte mit stark differierendem Freisetungsverhalten wurden gegeneinander verglichen. Die Studie ergab einen signifikanten Einfluß der Darreichungsform auf die Bioverfügbarkeit und letztendlich Bioinäquivalenz der untersuchten Produkte.

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie relevant die pharmazeutische Qualität der Produkte, inklusive ihrer biopharmazeutischen Eigenschaften, für die therapeutische Austauschbarkeit von Produkten sein kann. Auf dem Sektor pflanzlicher Produkte sind bis dato sehr wenige Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Darreichungsform auf *in vivo*-Verhältnisse und der Bioverfügbarkeit durchgeführt worden. Des weiteren fehlen Kenntnisse zu wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen oder alternativ pharmakodynamische Modelle, die eine Bestimmung der Bioverfügbarkeit ohne Kenntnis der pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe ermöglichen.

- 
- (1997) Gleichförmigkeit der Masse. Europäisches Arzneibuch, p. 142. European Directorate for the Quality of Medicines within the Council of Europe, Strasbourg.
- (1998) The Complete German Commission E Monographs, Therapeutic Guide To Herbal Medicines, Integrative Medicine Communications, Boston, Massachusetts.
- (1998) Pflanzliche Arzneimittel in der Europäischen Union, Studie im Auftrag der Europäischen Kommission AESGP, AESGP, Brüssel, Belgien.
- Abe,K. & Kimura,H. (1996) Amyloid beta toxicity consists of a  $Ca^{2+}$ -independent early phase and a  $Ca^{2+}$ -dependent late phase. *J.Neurochem.*, **67**, 2074-2078.
- Abe,K. & Saito,H. (1998) Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci.Res.*, **31**, 295-305.
- Ahlemeyer,B., Selke,D., Schaper,C., Klumpp,S., & Krieglstein,J. (2001) Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *Eur J Pharmacol*, **430** (1), 1-7.
- Ahlemeyer,B., Junker,V., Huhne,R., & Krieglstein,J. (2001) Neuroprotective effects of NV-31, a bilobalide-derived compound: evidence for an antioxidative mechanism. *Brain Res*, **890**, 338-342.
- Ahlemeyer,B., Mowes,A., & Krieglstein,J. (1999) Inhibition of serum deprivation- and staurosporine-induced neuronal apoptosis by Ginkgo biloba extract and some of its constituents. *Eur J Pharmacol*, **367**, 423-430.
- al-Zuhair,H., Abd,e., & el-Sayed,M.I. (1998) The effect of meclofenoxate with ginkgo biloba extract or zinc on lipid peroxide, some free radical scavengers and the cardiovascular system of aged rats. *Pharmacol Res*, **38**, 65-72.
- Allain,H., Lieury,A., Gandon,J.M., & d'Arbigny,P. (1995) The dual-coding test in elderly subjects: psychometric assessment of properties of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on Aging and Age-Related Disorders* (ed. by Y. Christen, Y. Courtois, & M. T. Droy-Lefaix), pp. 131-139. Elsevier, Paris.

- 
- Amidon,G.L., Lennernas,H., Shah,V.P., & Crison,J.R. (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, **12**, 413-420.
- Amri,H., Drieu,K., & Papadopoulos,V. (1997) Ex vivo regulation of adrenal cortical cell steroid and protein synthesis, in response to adrenocorticotrophic hormone stimulation, by the Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolide B. *Endocrinology*, **138**, 5415-5426.
- Amri,H., Ogwuegbu,S.O., Boujrad,N., Drieu,K., & Papadopoulos,V. (1996) In vivo regulation of peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolides. *Endocrinology*, **137**, 5707-5718.
- Artmann,G.M., Keller,U., & Schmid-Schönbein,H. (1991) Changes in red cell micromechanics as ex vivo bioassay for drug effects. *Clinical Hemorheology*, **11**.
- Artmann,G.M., Li,A., Ziemer,J., Schneider,G., & Sahn,U. (1996) A photometric method to analyze induced erythrocyte shape changes. *Biorheology*, **33**, 251-265.
- Artmann,G.M. & Schikarski,C. (1990) Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects red blood cells from oxidative damage. *Conference On Biorheology Shanghai*, **13**, 529-539.
- Auguet,M. & Clostre,F. (1997) Ginkgo biloba extract (EGb 761) and vasomotor adaption. Adaptive effects of Ginkgo biloba Extracts (EGb 761) (ed. by V. Papadopoulos, K. Drieu, & Y. Christen), pp. 1-7. Elsevier, Paris.
- Auguet,M., DeFeudis,F.V., & Clostre,F. (1982a) Effects of Ginkgo biloba on arterial smooth muscle responses to vasoactive stimuli. *Gen.Pharmacol.*, **13**, 169-171.
- Auguet,M., DeFeudis,F.V., Clostre,F., & Deghenghi,R. (1982b) Effects of an extract of Ginkgo biloba on rabbit isolated aorta. *Gen.Pharmacol.*, **13**, 225-230.
- Barkats,M., Venault,P., Christen,Y., & Cohen-Salmon,C. (1995) Effect of long-term treatment with EGb 761 on age-dependent structural changes in the hippocampi of three inbred mouse strains. *Life Sci*, **56**, 213-222.
- Barth,S.A., Inselmann,G., Engemann,R., & Heidemann,H.T. (1991) Influences of Ginkgo biloba on cyclosporin A induced lipid peroxidation in human liver microsomes in

- 
- comparison to vitamin E, glutathione and N- acetylcysteine. *Biochem Pharmacol.*, **41**, 1521-1526.
- Bastianetto,S. & Quirion,R. (2001) The protective abilities of Ginkgo biloba extract (EGb 761) against  $\beta$ -amyloid-induced toxicity depend on its flavonoid constituents. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a neuroprotective agent: from basic studies to clinical trials (ed. by Y. Christen), pp. 91-105. Éditions Solal, Marseille.
- Bastianetto,S., Ramassamy,C., Dore,S., Christen,Y., Poirier,J., & Quirion,R. (2000a) The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neurosci*, **12**, 1882-1890.
- Bastianetto,S., Zheng,W.H., & Quirion,R. (2000b) The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J Neurochem*.2000.Jun.;74.(6.):2268.-77., **74**, 2268-2277.
- Baudouin,C., Pisella,P.J., Ettaiche,M., Goldschild,M., Becquet,F., Gastaud,P., & Droy-Lefaix,M.T. (1999) Effects of EGb761 and superoxide dismutase in an experimental model of retinopathy generated by intravitreal production of superoxide anion radical. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **237**, 58-66.
- Bauer,U. (1984) 6-Month double-blind randomised clinical trial of Ginkgo biloba extract versus placebo in two parallel groups in patients suffering from peripheral arterial insufficiency. *Arzneimittelforschung.*, **34**, 716-720.
- Belougne,E., Aguejouf,O., Imbault,P., Azougagh,O.F., Doutremepuich,F., Droy-Lefaix,M.T., & Doutremepuich,C. (1996) Experimental thrombosis model induced by laser beam. Application of aspirin and an extract of Ginkgo biloba: EGb 761. *Thromb.Res.*, **82**, 453-458.
- Berridge,M.V. & Tan,A.S. (1993a) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch.Biochem.Biophys.*, **303**, 474-482.
- Berridge,M.V. & Tan,A.S. (1993b) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular

- 
- localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, **303**, 474-482.
- Blume,H.H. (1999) Bioverfügbarkeit von Phytopharmaka. *Phytopharmaka V, Forschung und klinische Anwendung* (ed. by D. Loew, H. H. Blume, & T. Dingermann), pp. 43-50. Steinkopf, Darmstadt.
- Blume,H. (1987) Was sind Arzneimittel mit problematischer Bioverfügbarkeit? *Pharm.Ztg.*, **132**, 2025.
- Bolanos-Jimenez,F., Manhaes,d.C., Sarhan,H., Prudhomme,N., Drieu,K., & Fillion,G. (1995) Stress-induced 5-HT1A receptor desensitization: protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Fundam.Clin Pharmacol.*, **9**, 169-174.
- Bourgain,R.H., Maes,L., Andries,R., & Braquet,P. (1986) Thrombus induction by endogenic paf-acether and its inhibition by Ginkgo Biloba extracts in the guinea pig. *Prostaglandins*, **32**, 142-144.
- Böyum,A. (1968) Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin.Invest.*, **21**, 77-89.
- Brailowsky,S. & Montiel,T. (1997) Motor function in young and aged hemiplegic rats: effects of a Ginkgo biloba extract. *Neurobiol Aging*, **18**, 219-227.
- Braquet,P. & Koltai,M. (1994) Vasculoprotective effect of the platelet-activating factor antagonist ginkgolide B isolated from Ginkgo biloba leaves. *Cardiovascular Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761)* (ed. by F. Clostre & F. V. DeFeudis), pp. 79-94. Elsevier, Paris.
- Brochet,D., Chermat,R., DeFeudis,F.V., & Drieu,K. (1999) Effects of single intraperitoneal injections of an extract of Ginkgo biloba (EGb 761) and its terpene trilactone constituents on barbital- induced narcosis in the mouse. *Gen Pharmacol*, **33**, 249-256.
- Bruno,C., Cuppini,R., Sartini,S., Cecchini,T., Ambrogini,P., & Bombardelli,E. (1993) Regeneration of motor nerves in bilobalide-treated rats. *Planta Med*, **59**, 302-307.
- Calapai,G., Crupi,A., Firenzuoli,F., Marciano,M.C., Squadrito,F., Inferrera,G., Parisi,A., Rizzo,A., Crisafulli,C., Fiore,A., & Caputi,A.P. (2000) Neuroprotective effects of

- 
- Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis [In Process Citation]. *Life Sci*, **67**, 2673-2683.
- Campos-Toimil,M., Lugnier,C., Droy-Lefaix,M.T., & Takeda,K. (2000) Inhibition of type 4 phosphodiesterase by rolipram and ginkgo biloba extract (EGb 761) decreases agonist-induced rises in internal calcium in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, E34-E40.
- Chandra,J., Samali,A., & Orrenius,S. (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **29**, 323-333.
- Chandrasekaran,K., Mehrabian,Z., Murray,P.D., Starkov,A.A., Spinnewyn,B., Drieu,K., & Fiskum,G. (2001) Ginkgo biloba extract (EGb 761) and bilobalide stimulate mitochondrial gene expression and protect against ischemic and excitotoxic neuronal death. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a neuroprotective agent: from basic studies to clinical trials (ed. by Y. Christen), pp. 139-151. Éditions Solal, Marseille.
- Chen,J.X., Zeng,H., Chen,X., Su,C.Y., & Lai,C.C. (2001) Induction of heme oxygenase-1 by Ginkgo Biloba Extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage. *Pharmacol Res*, **43**, 63-69.
- Cheung,F. & Siow,Y.L. (2001) Inhibition by ginkgolides and bilobalide of the production of nitric oxide in macrophages (THP-1) but not in endothelial cells (HUVEC)(1). *Biochem Pharmacol*, **61**, 503-510.
- Cheung,F., Siow,Y.L., & Chen,W.Z. (1999) Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, **58**, 1665-1673.
- Clark,W.M., Rinker,L.G., Lessov,N.S., Lowery,S.L., & Cipolla,M.J. (2001) Efficacy of Antioxidant Therapies in Transient Focal Ischemia in Mice. *Stroke*, **32**, 1000-1004.
- Darzynkiewicz,Z., Li,X., & Gong,J. (1994) Assays of Cell Viability: Discrimination of Cells Dying by Apoptosis. *Methods in Cell Biology, Flow Cytometry* (ed. by Z. Darzynkiewicz, J. P. Robinson, & H. A. Crissman), pp. 15-38. Academic Press, Inc., San Diego, California.

- 
- Deby,C., Deby-Dupont,G., Dister,M., & Pincemail,J. (1993) Efficiency of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in neutralizing ferryl ion-induced peroxidations: therapeutic implications. *Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a Free-Radical Scavenger* (ed. by C. Ferradini, M. T. Droy-Lefaix, & Y. Christen), pp. 13-26. Elsevier, Paris.
- DeFeudis,F.V. (1998) *Ginkgo biloba extract (EGb 761), from chemistry to the clinic*, Ullstein Medical Verlagsgesellschaft mbH & Co., Wiesbaden.
- Diamond,B.J., Shiflett,S.C., Feiwel,N., Matheis,R.J., Noskin,O., Richards,J.A., & Schoenberger,N.E. (2000) Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil*, **81**, 668-678.
- Dingermann,T. (1999) Essential similarity bei Phytopharmaka. *Phytopharmaka V, Forschung und klinische Anwendung* (ed. by D. Loew, H. H. Blume, & T. Dingermann), pp. 27-33. Steinkopf, Darmstadt.
- Drew,S. & Davies,E. (2001) Effectiveness of Ginkgo biloba in treating tinnitus: double blind, placebo controlled trial. *BMJ*, **322**, 73.
- Drieu,K., Moreau,J.-P., Eck,C.-R., McCabe,J., & Skinner,S. (1985) Animal Distribution and Preliminary Human Kinetic Studies of the Flavonoid Fraction of a Standardized Ginkgo Biloba Extract (GBE 761). *Stud.Org.Chem.(Flavonoids, Biflavonoids)*, **23**, 351-359.
- Drieu,K., Vranckx,R., Benassayad,C., Haourigi,M., Hassid,J., Yoa,R.G., Rapin,J.R., & Nunez,E.A. (2000) Effect of the extract of ginkgo biloba (EGb 761) on the circulating and cellular profiles of polyunsaturated fatty acids: correlation with the anti-oxidant properties of the extract [In Process Citation]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **63**, 293-300.
- Erdinçler,D.S., Karakoc,Y., Toplan,S., Önen,S., Sukyasyan,A., Beger,T., & Demiroglu,C. (1996) The effect of ginkgo biloba glycoside on the blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clinical Hemorheology*, **16**, 271-276.
- Ernst,E. & Stevinson,C. (1999) Ginkgo biloba for tinnitus: a review. *Clin Otolaryngol*, **24**, 164-167.

- 
- Etienne,A., Hecquet,F., Soulard,C., Spinnewyn,B., Clostre,F., & Braquet,P. (1985) In vivo inhibition of plasma protein leakage and Salmonella enteritidis-induced mortality in the rat by a specific paf-acether antagonist: BN 52021. *Agents and Actions*, **17**, 368-372.
- Fourtillan,J.B., Brisson,A.M., Girault,J., Ingrand,I., Decourt,J.Ph., Drieu,K., Jouenne,Ph., & Biber,A. (1995) Propriétés pharmacocinétiques du Bilobalide et des Ginkgolides A et B chez le sujet sain après administrations intraveineuses et orales d'extrait de Ginkgo biloba(EGb761) (Pharmacokinetics of Bilobalide, Ginkgolide A and B in healthy volunteers following oral and intravenous administrations of Ginkgo biloba extract (EGb 761)). *Thérapie*, **50**, 137-144.
- Fowler,J.S., Wang,G.J., Volkow,N.D., Logan,J., Franceschi,D., Franceschi,M., MacGregor,R., Shea,C., Garza,V., Liu,N., & Ding,Y.S. (2000) Evidence that ginkgo biloba extract does not inhibit MAO A and B in living human brain. *Life Sci*, **66**, L141-L146.
- Gardès-Albert,M., Khalil,A., Fortun,A., Bonnefont-Rousselot,D., Delattre,J., & Droy-Lefaix,M.T. (1995) Protective effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) against the lipid peroxidation of low-density lipoproteins initiated by  $^*OH$  and  $O_2^{*-}$  free radicals. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on Aging and Age-Related Disorders (ed. by Y. Christen, Y. Courtois, & M. T. Droy-Lefaix), pp. 49-63. Elsevier, Paris.
- Gerhardt,G., Rogalla,K., & Jaeger,J. (1990) [Drug therapy of disorders of cerebral performance. Randomized comparative study of dihydroergotoxine and Ginkgo biloba extract]. *Fortschr.Med.*, **108**, 384-388.
- Gohil,K., Maguire,J.J., & Packer,L. (2001) Ginkgo biloba extract, EGb 761, acitvates antioxidant response and genes for intracellular transport: An in vitro study with GeneChips and a human cancer cell line. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a neuroprotective agent: from basic studies to clinical trials (ed. by Y. Christen), pp. 13-31. Éditions Solal, Marseille.
- Grabe,H.J. & Freyberger,H.J. (1999) Ginkgo biloba in der Praxis - ein Therapeutikum zur Behandlung dementieller Erkrankungen. *Psychopharmakotherapie*, **6**, 152-157.

- 
- Greene,L.A. & Tischler,A.S. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 2424-2428.
- Haase,J., Halama,P., & Horr,R. (1996) [Effectiveness of brief infusions with Ginkgo biloba Special Extract EGb 761 in dementia of the vascular and Alzheimer type]. *Z Gerontol.Geriatr.*, **29**, 302-309.
- Haines,D.D., Bak,I., Ferdinandy,P., Mahmoud,F.F., Al-Harbi,S.A., Blasig,I.E., & Tosaki,A. (2000) Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *J Cardiovasc.Pharmacol.2000.Jan.;*35.(1.):37.-44., **35**, 37-44.
- Hawtin,S.R., Dobbins,A.C., Tailor,V.J., & Shearman,M.S. (1995) Beta-amyloid inhibition of MTT reduction is not mimicked by inhibitors of mitochondrial respiration. *Biochem.Soc.Trans.*, **23**, 56S.
- Hoyer,S., Lannert,H., Noldner,M., & Chatterjee,S.S. (1999) Damaged neuronal energy metabolism and behavior are improved by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J.Neural Transm.*, **106**, 1171-1188.
- Huguet,F., Drieu,K., & Piriou,A. (1994) Decreased cerebral 5-HT1A receptors during ageing: reversal by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J Pharm Pharmacol*, **46**, 316-318.
- Itil,T. & Martorano,D. (1995) Natural Substances in Psychiatry (Ginkgo biloba in Dementia). *Psychopharmacology Bulletin*, **31**, 147-158.
- Itil,T., Eralp,E., Tsambis,E., Itil,K.Z., & Stein,U. (1996) Central nervous system effects of Ginkgo biloba, a plant extract. *American Journal of Therapeutics*, **3**, 63-73.
- J.L.Robert (CMPM) (1995) Validation of analytical procedures: Methodology (The third international conference for registration of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use).
- Janssens,D., Michiels,C., Delaive,E., Eliaers,F., Drieu,K., & Remacle,J. (1995) Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide. *Biochem Pharmacol.*, **50**, 991-999.

- 
- Janssens,D., Michiels,C., Drieu,K., & Remacle,J. (1997) Ginkgo biloba extract, a metabolic regulator of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells. Adaptive effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) (ed. by V. Papadopoulos, K. Drieu, & Y. Christen), pp. 59-71. Elsevier, Paris.
- Joseph,J.A., Shukitt-Hale,B., Denisova,N.A., Bielinski,D., Martin,A., McEwen,J.J., & Bickford,P.C. (1999) Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.*, **19**, 8114-8121.
- Joseph,J.A., Shukitt-Hale,B., Denisova,N.A., Prior,R.L., Cao,G., Martin,A., Taglialatela,G., & Bickford,P.C. (1998) Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.*, **18**, 8047-8055.
- Jung,F., Mrowiezt,C., Kiesewetter,H., & Wenzel,E. (1990) Effect of Ginkgo biloba on Fluidity of Blood and Peripheral Microcirculation in Volunteers. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **40 (I)**, 589-593.
- Kanowski,S., Herrmann,W.M., Stephan,K., Wierich,W., & Horr,R. (1996) Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry.*, **29**, 47-56.
- Karcher,L., Zagermann,P., & Krieglstein,J. (1984) Effect of an extract of Ginkgo biloba on rat brain energy metabolism in hypoxia. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, **327**, 31-35.
- Kato,M., Saito,H., & Abe,K. (1997) Nanomolar amyloid beta protein-induced inhibition of cellular redox activity in cultured astrocytes. *J.Neurochem.*, **68**, 1889-1895.
- Khalil,A., Fortun,A., Bonnefont-Rousselot,D., Gardes-Albert,M., Lepage,S., Delattre,J., & Droy-Lefaix,M.T. (1996) Antioxidant effect of EGb 761 towards superoxide free radical action on LDL. *J Chim Phys*, **93**, 143-150.
- Kim,Y.S., Pyo,M.K., Park,K.M., Park,P.H., Hahn,B.S., Wu,S.J., & Yun-Choi,H.S. (1998) Antiplatelet and antithrombotic effects of a combination of ticlopidine and ginkgo biloba ext (EGb 761). *Thromb.Res.*, **91**, 33-38.

- 
- Klein,J., Chatterjee,S.S., & Loffelholz,K. (1997) Phospholipid breakdown and choline release under hypoxic conditions: inhibition by bilobalide, a constituent of Ginkgo biloba. *Brain Res.*, **755**, 347-350.
- Kobuchi,H., Droy-Lefaix,M.T., Christen,Y., & Packer,L. (1997) Ginkgo biloba extract (EGb 761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol.*, **53**, 897-903.
- Koch,E., Jaggy,H., & Chatterjee,S.S. (2000) Evidence for immunotoxic effects of crude Ginkgo biloba L. leaf extracts using the popliteal lymph node assay in the mouse. *Int J Immunopharmacol*, **22**, 229-236.
- Koltringer,P., Eber,O., Klima,G., Rothlauer,W., Wakonig,P., Langsteger,W., & Lind,P. (1989) [Microcirculation in parenteral Ginkgo biloba extract therapy]. *Wien.Klin.Wochenschr.*, **101**, 198-200.
- Koltringer,P., Langsteger,W., Klima,G., Reisecker,F., & Eber,O. (1993) [Hemorheologic effects of ginkgo biloba extract EGb 761. Dose-dependent effect of EGb 761 on microcirculation and viscoelasticity of blood]. *Fortschr.Med.*, **111**, 170-172.
- Költringer,P. & Eber,O. (1989) Die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation unter parenteraler Ginkgo-biloba-Therapie (Parenteral Treatment with Ginkgo-Biloba and Collagen induced Platelet Aggregation). *WMW (Therapeutischer Erfahrungsbericht)*, **5**, 92-94.
- Költringer,P., Langsteger,W., & Eber,O. (1995) Dose-dependent hemorheological effects and microcirculatory modifications following intravenous administration of Ginkgo biloba special extract EGb 761. *Clinical Hemorheology*, **15**, 649-656.
- Kriegelstein,J., Ausmeier,F., El-Abhar,H., Lippert,K., Welsch,M., Rupalla,K., & Henrich-Noack,P. (1995) Neuroprotective effects of Ginkgo biloba constituents. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **3**, 39-48.
- Kurihara,K., Wardlaw,A.J., Moqbel, ., & Kay,A.B. (1989) Inhibition of platelet-activating factor (PAF)-induced chemotaxis and PAF binding to human eosinophils and neutrophils by the specific ginkgolide-derived PAF antagonist, BN 52021. *J.Allergy Clin Immunol*, **83**, 83-90.

- 
- Kurtsoy,A., Canbay,S., Oktem,I.S., Akdemir,H., Koc,R.K., Menku,A., & Tucer,B. (2000) Effect of EGb-761 on vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *Res.Exp.Med.(Berl.)* 2000.Feb.;199.(4.):207.-15. , **199**, 207-215.
- Lamour,Y., Holloway,H.W., Rapoport,S.I., & Soncrant,T.T. (1992) Ginkgo biloba extract decreases local glucose utilization in the adult rat brain. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System (ed. by Y. Christen, J. Costentin, & M. Lacour), pp. 19-25. Elsevier, Paris.
- Le Bars,P.L., Katz,M.M., Berman,N., Itil,T.M., Freedman,A.M., & Schatzberg,A.F. (1997) A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *JAMA*, **278**, 1327-1332.
- Le Bars,P.L., Kieser,M., & Itil,K.Z. (2000) A 26-Week Analysis of a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Ginkgo biloba Extract EGb 761((R)) in Dementia. *Dement.Geriatr.Cogn.Disord.*2000.Jul.;11.(4.):230.-237., **11**, 230-237.
- Leutz, S. (2001) Neuronaler Zelltod bei der Alzheimer-Demenz – Einfluß von  $\beta$ -Amyloid und Amyloid Precursor Protein (Doktorarbeit)
- Liebgott,T., Miollan,M., Berchadsky,Y., Drieu,K., Culcasi,M., & Pietri,S. (2000) Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol*, **95**, 368-377.
- Lim,G.P., Chu,T., Yang,F., Beech,W., Frautschy,S.A., & Cole,G.M. (2001) The Curry Spice Curcumin Reduces Oxidative Damage and Amyloid Pathology in an Alzheimer Transgenic Mouse. *J Neurosci.*, **21**, 8370-8377.
- Lingaerde,O., Foreland,A.R., & Magnusson,A. (1999) Can winter depression be prevented by Ginkgo biloba extract? A placebo- controlled trial. *Acta Psychiatr Scand*, **100**, 62-66.
- Liu,Y., Peterson,D.A., Kimura,H., & Schubert,D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem*, **69**, 581-593.

- 
- Logani,S., Chen,M.C., Tran,T., Le,T., & Raffa,R.B. (2000) Actions of Ginkgo Biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia. *Life Sci*, **67**, 1389-1396.
- Luthringer,R., d'Arbigny,P., & Macher,J.P. (1995) Ginkgo biloba extract (EGb 761), EEG and event-related potentials mapping profile. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on Aging and Age-Related Disorders (ed. by Y. Christen, Y. Courtois, & M. T. Droy-Lefaix), pp. 107-118. Elsevier, Paris.
- MacGibbon,G.A., Cooper,G.J., & Dragunow,M. (1997) Acute application of human amylin, unlike beta-amyloid peptides, kills undifferentiated PC12 cells by apoptosis. *Neuroreport*, **8**, 3945-3950.
- Maitra,I., Marcocci,L., Droy-Lefaix,M.T., & Packer,L. (1995) Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Pharmacol.*, **49**, 1649-1655.
- Marcocci,L., Maguire,J.J., Droy-Lefaix,M.T., & Packer,L. (1994) The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Biophys.Res.Commun.*, **201**, 748-755.
- Mason,R.P., Estermyer,J.D., Kelly,J.F., & Mason,P.E. (1996) Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **222**, 78-82.
- Maurer,K. (2001) Clinical Studies of Ginkgo biloba Extract EGb 761 for Treatment of Alzheimer's Disease and Multi-Infarct Dementia: A Therapeutic Option in Treating Dementia. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a neuroprotective agent: from basic studies to clinical trials (ed. by Y. Christen), pp. 225-230. Éditions Solal, Marseille.
- Maurer,K., Ihl,R., Dierks,T., & Frolich,L. (1997) Clinical efficacy of Ginkgo biloba special extract EGb 761 in dementia of the Alzheimer type. *J.Psychiatr.Res.*, **31**, 645-655.
- Meyer,B. (1986a) [A multicenter study of tinnitus. Epidemiology and therapy]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*, **103**, 185-188.
- Meyer,B. (1986b) [Multicenter randomized double-blind drug vs. placebo study of the treatment of tinnitus with Ginkgo biloba extract]. *Presse Med*, **15**, 1562-1564.

- 
- Michiels,C., Arnould,T., Janssens,D., Eliaers,F., Drieu,K., & Remacle,J. (1994) Key role of hypoxia and endothelial cells in vascular diseases: effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Cardiovascular Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761)* (ed. by F. Clostre & F. V. DeFeudis), pp. 49-57. Elsevier, Paris.
- Mix,J.A. & Crews,W.D.J. (2000) An examination of the efficacy of Ginkgo biloba extract EGb761 on the neuropsychologic functioning of cognitively intact older adults. *J Altern Complement Med*, **6**, 219-229.
- Monboisse,J.C., Garnotel,R., Droy-Lefaix,M.T., & Borel,J.P. (1993) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) inhibits superoxide-anion production by human neutrophils. *Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a Free-Radical Scavenger* (ed. by C. Ferradini, M. T. Droy-Lefaix, & Y. Christen), pp. 123-128. Elsevier, Paris.
- Muller,W.E., Koch,S., Eckert,A., Hartmann,H., & Scheuer,K. (1995) beta-Amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Research*, **674**, 133-136.
- Nathan,P. (2000) Can the cognitive enhancing effects of ginkgo biloba be explained by its pharmacology? [In Process Citation]. *Med Hypotheses*, **55**, 491-493.
- Ni,Y., Zhao,B., Hou,J., & Xin,W. (1996) Preventive effect of Ginkgo biloba extract on apoptosis in rat cerebellar neuronal cells induced by hydroxyl radicals. *Neurosci.Lett.*, **214** , 115-118.
- Nunez,D., Chignard,M., Korth,R., & Le Couedic,J.P. (1986) Specific Inhibition of PAF-acether-induced Platelet Activation by BN 52021 and Comparison with the PAF-acether Inhibitors Kadsurenone and CV 3988. *European Journal of Pharmacology*, **123**, 197-205.
- Oyama,Y., Chikahisa,L., Ueha,T., Kanemaru,K., & Noda,K. (1996) Ginkgo biloba extract protects brain neurons against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res.*, **712** , 349-352.
- Oyama,Y., Fuchs,P.A., Katayama,N., & Noda,K. (1994) Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca(2+)- loaded brain neurons. *Brain Res.*, **635**, 125-129.

- 
- Ozenirler,S., Dincer,S., Akyol,G., Ozogul,C., & Oz,E. (1997) The protective effect of Ginkgo biloba extract on CCl4-induced hepatic damage. *Acta Physiol Hung*, **85**, 277-285.
- Paasche,G., Gartner,U., Germer,A., Grosche,J., & Reichenbach,A. (2000) Mitochondria of retinal Muller (Glial) cells: the effects of aging and of application of free radical scavengers [In Process Citation]. *Ophthalmic Res*, **32**, 229-236.
- Pardon,M.C., Joubert,C., Perez-Diaz,F., Christen,Y., Launay,J.M., & Cohen-Salmon,C. (2000) In vivo regulation of cerebral monoamine oxidase activity in senescent controls and chronically stressed mice by long-term treatment with Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Mech.Ageing Dev.*2000.Feb.15.;113.(3.):157.-68., **113**, 157-168.
- Pardon,M.C., Launay,J.M., Christen,Y., & Cohen-Salmon,C. (1998) Effects of long-term treatment with Ginkgo biloba extract (EGb 761) on in vivo regulation of cerebral monoamine oxidase activity in chronically stressed senescent mice. Ginkgo biloba Extract (EGb 761): Lessons from Cell Biology (ed. by L. Packer & Y. Christen), pp. 101-108. Elsevier, Paris.
- Patel,A.J., Gunasekera,S., Jen,A., & De Silva,H.A.R. (1996) beta-amyloid-mediated inhibition of redox activity (MTT reduction) is not an indicator of astroglial degeneration. *Neuroreport*, **7**, 2026-2030.
- Pierre,S., Jamme,I., Droy-Lefaix,M.T., Nouvelot,A., & Maixent,J.M. (1999) Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects Na,K-ATPase activity during cerebral ischemia in mice. *Neuroreport*, **10**, 47-51.
- Pietri,S., Maurelli,E., Drieu,K., & Culcasi,M. (1997) Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J.Mol.Cell Cardiol.*, **29**, 733-742.
- Pincemail,J., Dupuis,M., Nasr,C., Hans,P., Haag-Berrurier,M., Anton,R., & Deby,C. (1989) Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia*, **45**, 708-712.
- Pittler,M.H. & Ernst,E. (2000) Ginkgo Biloba Extract for the Treatment of Intermittent Claudication: A Meta-Analysis of Randomized Trials. *The American Journal of Medicine*, **108**, 276-281.

- 
- Porsolt,R.D., Martin,P., Fromage,S., Lenègre,A., & Drieu,K. (1992) Anti-stress effects of EGb 761 in rodent models. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System (ed. by Y. Christen, J. Costentin, & M. Lacour), pp. 135-145. Elsevier, Paris.
- Porsolt,R.D., Roux,S., & Drieu,K. (2000) Evaluation of a ginkgo biloba extract (EGb 761) in functional tests for monoamine oxidase inhibition. *Arzneimittelforschung*.2000.Mar.;50.(3.):232.-5., **50**, 232-235.
- Ramassamy,C., Christen,Y., Clostre,F., & Costentin,J. (1992) The Ginkgo biloba extract, EGb761, increases synaptosomal uptake of 5- hydroxytryptamine: in-vitro and ex-vivo studies. *J.Pharm.Pharmacol.*, **44**, 943-945.
- Ramassamy,C., Christen,Y., Clostre,F., & Costentin,J. (1993) Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents free-radical modifications of synaptosomal membrane fluidity and ability to take up serotonin. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a Free-Radical Scavenger (ed. by C. Ferradini, M. T. Droy-Lefaix, & Y. Christen), pp. 39-50. Elsevier, Paris.
- Ramassamy,C., Christen,Y., & Poirier,J. (2001) Ginkgo biloba extract (EGb 761),  $\beta$ -amyloid peptide and apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a neuroprotective agent: from basic studies to clinical trials (ed. by Y. Christen), pp. 71-89. Éditions Solal, Marseille.
- Ramassamy,C., Krzywkowski,P., Bastianetto,S., Averill,D., Christen,Y., Quirion,R., & Poirier,J. (1998) Apolipoprotein E, oxidative stress and Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease. Ginkgo biloba Extract (EGb 761): Lessons from Cell Biology (ed. by L. Packer & Y. Christen), pp. 69-83. Elsevier, Paris.
- Ranchon,I., Cluzel,J., Gorrand,J.-M., Martinez,V., & Doly,D. (2001) Prevention of light-induced retinal neurodegeneration by Ginkgo biloba extract (EGb 761). Ginkgo biloba Extract (EGb 761) as a neuroprotective agent: from basic studies to clinical trials (ed. by Y. Christen), pp. 33-52. Éditions Solal, Marseille.
- Rapin,J.R., Provost,P., & Drieu,K. (1997) Ginkgo biloba extract (EGb 761) anti-stress effects on hippocampal glucocorticoid receptors: comparison with diazepam. Adaptive effects

- 
- of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) (ed. by V. Papadopoulos, K. Drieu, & Y. Christen), pp. 129-138. Elsevier, Paris.
- Reinhard,E. (1990) *Pharmazeutische Biologie*, 4 edn, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Rigney,U., Kimber,S., & Hindmarch,I. (1999) The effects of acute doses of standardized Ginkgo biloba extract on memory and psychomotor performance in volunteers. *Phytother Res*, **13**, 408-415.
- Rogue,P. & Malviya,A.N. (1996) Inhibition of protein kinase C by Ginkgo biloba extract (EGb 761). Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on Neuronal Plasticity (ed. by Y. Christen, M. T. Droy-Lefaix, & Macías-Núñez), pp. 1-6. Elsevier, Paris.
- Rudofsky,G. (1987) [Effect of Ginkgo biloba extract in arterial occlusive disease. Randomized placebo controlled crossover study]. *Fortschr.Med.*, **105**, 397-400.
- Sasaki,K., Hatta,S., Haga,M., & Ohshika,H. (1999) Effects of bilobalide on gamma-aminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase in mouse brain. *Eur J Pharmacol*, **367**, 165-173.
- Sastre,J., Millan,A., Garcia,d.l.A., Pla,R., Juan,G., Pallardo, O'Connor,E., Martin,J.A., Droy-Lefaix,M.T., & Vina,J. (1998) A Ginkgo biloba extract (EGb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Radic.Biol.Med.*, **24**, 298-304.
- Sastre,J., Pallardo,F.V., & Vina,J. (2000) Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*, **49**, 427-435.
- Schindowski,K., Leutner,S., Kressmann,S., Eckert,A., & Muller,W.E. (2001) Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761). *J Neural Transm.*, **108**, 969-978.
- Scholtyssek,H., Damerau,W., Wessel,R., & Schimke,I. (1997) Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. *Chem.Biol.Interact.*, **106**, 183-190.

- 
- Schug,B.S., Schubert-Zsilavec,M., & Blume,H.H. (1999) BCS - Wegweiser bei Phytopharmaka. Phytopharmaka V, Forschung und klinische Anwendung (ed. by D. Loew, H. H. Blume, & T. Dinger mann), pp. 35-42. Steinkopf, Darmstadt.
- Sharma,H.S., Drieu,K., Alm,P., & Westman,J. (1999) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase, edema and cell injury following heat stress are reduced by pretreatment with EGb-761 in the rat. *Journal of Thermal Biology*, **24**, 439-445.
- Shearman,M.S., Ragan,C.I., & Iversen,L.L. (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **91**, 1470-1474.
- Shen,J., Wang,J., Zhao,B., Hou,J., Gao,T., & Xin,W. (1998) Effects of EGb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo. *Biochim Biophys Acta*, **1406**, 228-236.
- Shih,J.C., Chen,K., Ridd,M.J., & Seif,I. (2000) Ginkgo biloba abolishes aggression in mice lacking MAO A. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2**, 467-471.
- Sloley,B.D., Urichuk,L.J., Morley,P., Durkin,J., Shan,J.J., Pang,P.K., & Coutts,R.T. (2000) Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential Neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves. *J Pharm Pharmacol*, **52**, 451-459.
- Soybir,G., Koksoy,F., Ekiz,F., Yalcin,O., Fincan,K., Haklar,G., & Yuksel,M. (1999) The effects of free oxygen radical scavenger and platelet-activating factor antagonist agents in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*, **19**, 143-149.
- Spinnewyn,B. (1992) Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against delayed neuronal death in gerbil. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System (ed. by Y. Christen, J. Costentin, & M. Lacour), pp. 113-118. Elsevier, Paris.
- Spinnewyn,B., Blavet,N., & Clostre,F. (1986) Effets de l' extrait de Ginkgo biloba sur un modèle d' ischemie cérébrale chez la gerbille. *La Presse Médicale*, **15**, 1511.
- Spinnewyn,B., Blavet,N., Clostre,F., Bazan,N., & Braquet,P. (1987) Involvement of platelet-activating factor (PAF) in cerebral post- ischemic phase in Mongolian gerbils. *Prostaglandins*, **34**, 337-349.

- 
- Stoll,S., Scheuer,K., Pohl,O., & Muller,W.E. (1996) Ginkgo biloba extract (EGb 761) independently improves changes in passive avoidance learning and brain membrane fluidity in the aging mouse. *Pharmacopsychiatry.*, **29**, 144-149.
- Taylor,J.E. (1992) In vitro interactions of EGb 761 with biogenic amine uptake sites and NMDA receptors. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on the Central Nervous System (ed. by Y. Christen, J. Costentin, & M. Lacour), pp. 1-5. Editions Scientifiques Elsevier, Paris.
- Terzi,E., Holzemann,G., & Seelig,J. (1994) Alzheimer beta-amyloid peptide 25-35: electrostatic interactions with phospholipid membranes. *Biochemistry*, **33**, 7434-7441.
- Terzi,E., Holzemann,G., & Seelig,J. (1997) Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes. *Biochemistry*, **36**, 14845-14852.
- Tighilet,B. & Lacour,M. (1995) Pharmacological activity of the Ginkgo biloba extract (EGb 761) on equilibrium function recovery in the unilateral vestibular neurectomized cat. *J Vestib Res*, **5**, 187-200.
- Topp,S., Knoefel,W.T., Schutte,A., Brillhoff,S., Rogiers,X., & Gundlach,M. (2001) Ginkgo biloba (EGB 761) improves microcirculation after warm ischemia of the rat liver. *Transplant Proc*, **33**, 979-981.
- Tosaki,A., Pali,T., & Droy-Lefaix,M.T. (1996) Effects of Ginkgo biloba extract and preconditioning on the diabetic rat myocardium. *Diabetologia*, **39**, 1255-1262.
- Toussaint,O., Eliaers,F., Houbion,A., Remacle,J., & Drieu,K. (1995) Protective effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and bilobalide against mortality and accelerated cellular aging under stressful conditions. Effects of Ginkgo biloba Extract (EGb 761) on Aging and Age-Related Disorders (ed. by Y. Christen, Y. Courtois, & M. T. Droy-Lefaix), pp. 1-16. Elsevier, Paris.
- Trovero,F., Brochet,D., Tassin,J.P., & Drieu,K. (1999) Ginkgo biloba extract EGb761 reduces the development of amphetamine- induced behavioral sensitization: effects on hippocampal type II corticosteroid receptors. *Brain Res.*, **818**, 135-139.
- Umegaki,K., Shinozuka,K., Watarai,K., Takenaka,H., Yoshimura,M., Daohua,P., & Esashi,T. (2000) Ginkgo biloba extract attenuates the development of hypertension in

- 
- deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats.  
*Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.*2000.Apr.;27.(4.):277.-82., **27**, 277-282.
- van Beek,T.A., Bombardelli,E., Morazzoni,P., & Peterlongo,F. (1998) Ginkgo biloba L. *Fitoterapia*, **LXIX**, 195-244.
- van Dongen,M.C., van Rossum,E., Kessels,A.G., Sielhorst,H.J., & Knipschild,P.G. (2000) The efficacy of ginkgo for elderly people with dementia and age-associated memory impairment: new results of a randomized clinical trial. *J Am Geriatr Soc*, **48**, 1183-1194.
- Varga,E., Bodi,A., Ferdinandy,P., Droy-Lefaix,M.T., Blasig,I.E., & Tosaki,A. (1999) The protective effect of EGb 761 in isolated ischemic/reperfused rat hearts: a link between cardiac function and nitric oxide production. *J Cardiovasc Pharmacol*, **34**, 711-717.
- Watanabe,C.M., Wolfram,S., Ader,P., Rimbach,G., Packer,L., Maguire,J.J., Schultz,P.G., & Gohil,K. (2001) The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc Natl Acad Sci U S A* , **98**, 6577-6580.
- White,H.L., Scates,P.W., & Cooper,B.R. (1996) Extracts of Ginkgo biloba leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Sci.*, **58**, 1315-1321.
- Winter,J.C. (1998) The effects of an extract of Ginkgo biloba, EGb 761, on cognitive behavior and longevity in the rat. *Physiology & Behavior*, **63**, 425-433.
- Winter,J.C. & Timineri,D. (1999) The discriminative stimulus properties of EGb 761, an extract of Ginkgo biloba. *Pharmacol Biochem Behav*, **62**, 543-547.
- Wirth,S., Stemmelin,J., Will,B., Christen,Y.V.E.S., & Di Scala,G. (2000) Facilitative effects of EGb 761 on olfactory recognition in young and aged rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.*2000.Feb.;65.(2.):321.-6., **65**, 321-326.
- Witte,S., Anadere,I., & Walitza,E. (1992) [Improvement of hemorheology with ginkgo biloba extract. Decreasing a cardiovascular risk factor]. *Fortschr.Med.*, **110**, 247-250.
- Wu,W.R. & Zhu,X.Z. (1999) Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of Ginkgo biloba extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. *Life Sci*, **65**, 157-164.

- 
- Wurglics,M., Westerhoff,K., Kaunzinger,A., Wilke,A., Baumeister,A., Dressman,J., & Schubert-Zsilavec,M. (2001) Batch-to-Batch Reproducibility of St. John's Wort Preparations. *Pharmacopsychiatry*, **34**, S152-S156
- Xin,W., Wei,T., Chen,C., Ni,Y., Zhao,B., & Hou,J. (2000) Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb761 and its constituents. *Toxicology*, **148**, 103-110.
- Yan,L.J., Droy-Lefaix,M.T., & Packer,L. (1995) Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochem Biophys.Res.Commun.*, **212**, 360-366.
- Yao,Z., Drieu,K., & Papadopoulos,V. (2001) The Ginkgo biloba extract EGb 761 rescues the PC12 neuronal cells from beta-amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of beta-amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands. *Brain Res*, **889**, 181-190.
- Zhou,L.J., Song,W., Zhu,X.Z., Chen,Z.L., Yin,M.L., & Cheng,X.F. (2000) Protective effects of bilobalide on amyloid beta-peptide 25-35-induced PC12 cell cytotoxicity. *Acta Pharmacol Sin*, **21**, 75-79.
- Zhou,L.J. & Zhu,X.Z. (2000) Reactive oxygen species-induced apoptosis in PC12 cells and protective effect of bilobalide. *J Pharmacol.Exp.Ther.*2000.Jun.;293.(3.):982.-8., **293**, 982-988.

## Publikationen

1. Kressmann, S.; Müller, W.E. and Blume, H.H. (2002) Pharmaceutical quality of different Ginkgo biloba brands. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, in press.
2. Kressmann, S., Biber, A.; Wonnemann, M.; Schug, B.; Müller W.E. and Blume, H.H.; Significant impact of pharmaceutical quality of herbal products on bioavailability of active ingredients: Ginkgo biloba. In Vorbereitung.
3. Schindowski, K.; Leutner, S.; Kressmann, S.; Eckert, A. and Müller W.E. (2001) Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J Neural Transm.* 108 (8-9): 969-978.

## DANKSAGUNG

---

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Walter E. Müller, der mir diese Dissertation ermöglichte und unter dessen Leitung am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt am Main die vorliegende Arbeit angefertigt wurde.

Herrn Prof. Dr. Henning Blume, der mir als mein zweiter Doktorvater bei vielen Fragen und Problemen behilflich war und auch die vorliegende Arbeit und die Publikationen begutachtet hat.

Frau Dr. Barbara Schug, unter deren Leitung die klinische Studie reibungslos verlief und die mir auch auf anderen Gebieten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. Meinolf Wonnemann, einem ehemaligen Arbeitskollegen, der mich stets tatkräftig, insbesondere bei der Durchführung der klinischen Studie unter Aufopferung seines Wochenendes, unterstützte.

Herrn Dr. Anton Biber, der mich während meiner gesamten Doktorarbeit mit Rat und Tat von nah und fern unterstützt und betreut und auch die Publikationen begutachtet hat.

Frau Dr. Katharina Schindowski, Frau Katja Leibrand und Frau Monika Schuster, die mir bei Erlernung vieler Methoden und Verfahren behilflich waren.

Insbesondere meiner Familie für ihr Verständnis, die moralische und finanzielle Unterstützung: meinen Eltern, meinem Zwilling Katrin und meiner Schwester Martina, die gleichzeitig eine Dissertation anfertigte und ähnliche Probleme meisterte.

Meiner Freundin Sonka Endelmann, die alle Sorgen und Probleme mit mir teilte und immer für mich da war.

Meiner ALLGG, Gisela Holoubek, und allen anderen Kollegen und Freunden im Institut, die dazu beigetragen haben, daß ich meistens gerne ins Labor gegangen bin und manche angenehme Stunde verbracht habe.

## Lebenslauf

Name: Kreßmann  
Vorname: Sabine  
Geburtsdatum: 31.08.1972  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### Schul Ausbildung

08/1978 – 07/1982 Wilhelm-Hauff-Schule, Grundschule in Neu-Isenburg  
08/1982 – 06/1991 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Frankfurt/M.  
06/1991 Abitur

### Berufsausbildung

08/1991 – 01/1993 Ausbildung zur Industriekauffrau bei der Imbau GmbH in Neu-Isenburg

### Studium

04/1993 – 04/1997 Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/M.  
03/1995 Erstes pharmazeutisches Staatsexamen  
04/1997 Zweites pharmazeutisches Staatsexamen  
05/1998 Drittes pharmazeutisches Staatsexamen  
07/1998 Approbation als Apothekerin

### Praktische Tätigkeiten

05/1997– 10/1997 Praktikum in der Schweizer-Apotheke, Frankfurt/M.  
11/1997 – 04/1998 Praktikum bei der Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH in Frankfurt/M.

### Promotion

05/1998 – 2001 Anfertigung einer Promotionsarbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W.E. Müller und Herrn Prof. Dr. H.H. Blume, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Biozentrum, J.W. Goeth-Universität, Frankfurt/M.

### Zusatzqualifikation

05/1999 –  
vorauss. 05/2002 Weiterbildung zur Fachapothekerin für Arzneimittelinformation