

Ginkgo biloba

**Untersuchungen zur Bioanalytik und ZNS-Bioverfügbarkeit von Flavonoiden  
und zur Expression der Atmungskettenkomplexen durch EGb 761 an Ratten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

**Laura Rangel-Ordóñez**

aus Apan, Hidalgo, Mexiko

Frankfurt am Main (2008)

(D30)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> (D30: D=Dissertation 30=Bibliothekskennzeichen)

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe- Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Herr Professor Dr. Manfred Schubert-Zsilavec

Herr Professor Dr. Theodor Dingermann

Datum der Disputation: 21.Juli 2008

*Wenn Du ein Schiff bauen willst,  
so trommle nicht Männer zusammen,  
um Holz zu beschaffen, Werkzeuge vorzubereiten,  
die Arbeit einzuteilen und Aufgaben zu vergeben,  
sondern lehre die Männer die Sehnsucht nach dem endlosen weiten Meer!*

Antoine de Saint-Exupéry



---

2.1.3.7. Stabilität .....	56
3. BIOVERFÜGBARKEIT VON GINKGOFLAVONOIDEN IN RATTEN.....	57
3.1. Experimenteller Teil.....	57
3.1.1. Haltungsbedingungen der Tiere .....	57
3.1.2. Studie 1: Bioverfügbarkeit nach Einfach- und Mehrfachgabe.....	57
3.1.2.1. Einfachgabe.....	58
3.1.2.2. Mehrfachgabe.....	58
3.1.3. Probenentnahme.....	58
3.1.4. Studie 2: Dosierungseffekt und Verteilung im ZNS .....	59
3.2. Ergebnisse .....	60
3.2.1. Studie 1: Pharmakokinetik nach Einfach- und Mehrfachgabe.....	60
3.2.1.1. Einfachgabe.....	61
3.2.1.2. Mehrfachgabe.....	64
3.2.2. Studie 2: Verteilung im ZNS und Dosierungseffekt .....	68
4. PROTEOMICSSTUDIE .....	72
4.1. Theoretische Grundlagen .....	72
4.1.1. Mitochondrienaufbau .....	72
4.1.1.1. Atmungskettenfunktion.....	75
4.1.2. Proteintrennung.....	76
4.1.2.1. Elektrophorese.....	76
4.2. Experimenteller Teil.....	83
4.2.1. Tierfütterung und Haltungsbedingungen .....	83
4.2.2. Homogenisierung und Lagerung der Proben .....	84
4.2.3. Solubilisierung der Proben.....	85
4.2.4. Durchführung der nativen Gelelektrophorese.....	86
4.2.5. SDS-PAGE.....	87
4.2.5.1. Vorbereitung von SDS-Gelen .....	88
4.2.5.2. SDS-PAGE Durchführung .....	88
4.2.6. Identifizierung und Quantifizierung.....	88
4.2.6.1. Coomassie-blau-Färbung .....	88
4.2.6.2. Silberfärbung.....	89
4.2.7. Katalytische Aktivität In-Gel .....	90
4.3. Ergebnisse .....	91
4.3.1. Vorversuch.....	91
4.3.2. Ginkgoversuche .....	93
5. DISKUSSION.....	96
6. DISCUSSION .....	102
7. GERÄTE UND MATERIALIEN .....	107
7.1. Bioanalytik und Bioverfügbarkeit der Flavonoide.....	107
7.1.1. Extrakt, Referenzsubstanzen und Tiere.....	107
7.1.2. Lösungsmittel und Chemikalien .....	107
7.1.3. Geräte und Zubehör .....	108
7.2. Proteomicsstudie .....	111

---

7.2.1. Extrakt und Tiere .....	111
7.2.2. Lösungsmittel und Chemikalien .....	111
7.2.3. Gel-Vorbereitung .....	114
7.2.4. Geräte und Zubehör .....	117
8. ANHANG: ZUGELASSENE GINKGOPRÄPARATE .....	119
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	120
TABELLENVERZEICHNIS .....	123
LITERATURVERZEICHNIS .....	124
LEBENS LAUF .....	136
DANKSAGUNG.....	139
ERKLÄRUNG .....	143



# ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bedeutung
AD	Morbus Alzheimer (Alzheimer Disease)
AMG	Arzneimittelgesetz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATC	Anatomisch-Therapeutisch-Chemisches Klassifikationssystem
ATP	Adenosintriphosphat (Adenosine triphosphate)
AUC <sub>0-72</sub>	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (von t=0 h bis t =72 h)
AUC <sub>72h-inf</sub>	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (von t=72 h bis unendlich)
AUC <sub>0-inf</sub>	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (von t=0 h bis unendlich)
Bb	Bilobalid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BN-PAGE	Blau-Native-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
Cl <sub>T</sub>	Gesamtkörperclearance
C <sub>max</sub>	Maximale Plasmakonzentration
CN-PAGE	Clear-Nativ-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Clear Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
CTFE	Chlortrifluorethylen
Da	Dalton
DDM	Dodecylmaltosid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdeoxycholat
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGB	<i>Ginkgo biloba</i> Extrakt
EGB 761	<i>Ginkgo biloba</i> Spezialextrakt EGB 761
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FC	Frontaler Cortex
FD	Fluoreszenz-Detektion
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GA	Ginkgolid A
GABA	γ-Aminobuttersäure
GB	Ginkgolid B
GlyR	Glycin-Rezeptoren
H	Hippocampus
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
I.D.	Innendurchmesser
I.E.	Internationale Einheit
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KG	Körpergewicht
KH	Kleinhirn
LLOQ	Untere Bestimmungsgrenze
LOD	Nachweisgrenze
λ <sub>z</sub>	Eliminationskonstant
μ	Nominale Konzentration
M	Molarkonzentration
MAO	Monoaminoxidase
MeOH	Methanol

Abkürzung	Bedeutung
$\text{Na}_2 (\text{HPO}_4)_3$	Natriumdihydrogenphosphat
$\text{Na}_3\text{PO}_4$	Trinatriumphosphat
$\text{NaCl}$	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Nucleotid
$\text{NaOH}$	Natriumhydroxid
OXPHOS	Oxidativen Phosphorylierung
PAF	Plättchenaktivierender Faktor (platelet activating factor)
PAFR	Plättchenaktivierender Faktor-Rezeptor (platelet activating factor receptor)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PBR	Periphere Benzodiazepin-Rezeptor
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PFTE	Polytetrafluorethylen
pH	pH-Wert (Potential of hydrogen )
R	Rest des Gehirns
$R^2$	Determinationskoeffizient
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase (Reversed-Phase)
R.S.D.	Relative Standardabweichung (auch Variationskoeffizient, $V_k$ genannt)
S	Striatum
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean)
t	Zeit
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
TBHQ	tert-Butylhydrochinon (Tert-Butyl-Hydroquinone)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
$T_{\max}$	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasma- oder Hirnkonzentration
TRIS	Tris (hydroxymethyl)aminomethane Puffer
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
$V_z$	Verteilungsvolumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
$\bar{x}$	Mittlere Konzentration
ZNS	Zentrales Nervensystem

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine große Anzahl pharmakologischer und klinischer Studien zeigt die Wirksamkeit des standardisierten *Ginkgo biloba* Extraktes EGb 761 bei vaskulären und kognitiven Störungen, wie der Alzheimer-Krankheit, der vaskulären Demenz und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Experimentelle Ergebnisse weisen darauf hin, dass Terpenlaktone und Flavonolglykoside für die meisten pharmakologischen Wirkungen von EGb 761 verantwortlich sind. Allerdings gibt es wenige Studien, die die orale Bioverfügbarkeit von Terpenlaktonen und besonders von Flavonolglykosiden aus *Ginkgo biloba* im Blut oder Zentralnervensystem untersuchten. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Fähigkeit der Flavonoidglykosiden bzw. deren Metaboliten die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden im Tierversuch an männlichen Sprague-Dawley-Ratten erforscht. Untersucht wurden dabei orale Einfach- und Mehrfachgaben von EGb 761 über einen Zeitraum von 8 Tagen in den Dosierungen 100 bzw. 600 mg Extrakt pro kg Körpergewicht.

Zusätzlich wurde die Verteilung der Ginkgoflavonolmetabolite in den unterschiedlichen Bereichen des Gehirns untersucht (Hippocampus, frontaler Cortex, Striatum und Kleinhirn). Zu diesem Zweck wurde eine HPLC-Fluoreszenzmethode für die Ermittlung der Plasma- und Gehirnkonzentrationen der Flavonoidmetaboliten (Derivate von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin) entwickelt und validiert. In beiden Studien (Einfach- und Mehrfachgabe) wurden Flavonoidmetaboliten im Plasma und im Gehirn nachgewiesen. Dabei wurden Metaboliten in allen untersuchten Gehirnbereichen gefunden. Bei der Dosierung von 100 mg/kg war Kämpferol vorzugsweise im frontalen Cortex lokalisiert, während die anderen Flavonole in allen Regionen vergleichbare Konzentrationen aufwiesen. Bei der höheren Dosierung von 600 mg/kg waren die Konzentrationen der Flavonolmetaboliten in allen Gehirnbereichen vergleichbar. Obgleich die vier untersuchten Gehirnbereiche nur 38% des gesamten Gehirns darstellten, wurden die meisten Ginkgoflavonole in diesen Regionen gefunden. Im übrigen Gehirngewebe wurden nur begrenzte Mengen von Flavonolen nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es erstmalig gelungen ist, im Tierversuch die Bioverfügbarkeit einer der therapeutisch aktiven Substanzklassen von *Ginkgo biloba* - die Flavonoide - sowohl im Plasma als auch im ZNS nachzuweisen.

## SUMMARY

A large number of pharmacological and clinical studies have shown the efficacy of the standardized quantified *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in vascular and cognitive disorders such as Alzheimer`s disease, vascular dementia, and peripheral arterial occlusive disease. Experimental results indicate that terpene lactones and Ginkgo flavonol glycosides are responsible for most of the pharmacological actions of EGb 761. However, studies concerning the oral bioavailability of the terpene lactones and in particular, the Ginkgo flavonol glycosides in the blood or central nervous system, are rare. Therefore, the ability of flavonoid glycosides to cross the blood-brain barrier in male Sprague-Dawley rats after single and repeated (8 days) oral administration of 100 or 600 mg per kg EGb 761 was investigated.

In addition, the distribution of Ginkgo flavonol metabolites in the different areas of the brain (hippocampus, frontal cortex, striatum, and cerebellum) was studied. For this purpose, an HPLC fluorescence method for the determination of the plasma and brain tissue concentrations of the Ginkgo flavonoid metabolites (quercetin, kaempferol and isorhamnetin derivatives) was validated and developed. In both single and repeated dose studies, flavonoid metabolites were found in the plasma and brain. The metabolites could be detected in all of the brain areas investigated. In the low dose group (100 mg/kg), kaempferol preferably localized in the in the frontal cortex, whereas, the concentrations of the other flavonols were comparable in all regions. At the higher dose (600 mg/kg), the concentrations of all flavonol metabolites were comparable in all brain areas. Although the four investigated brain areas represent only 38% of the whole brain, most of the Ginkgo flavonols were found in these regions. In the remaining brain only marginal amounts of flavonols were found.

In summary it can be stated that it was possible, for the first time, to demonstrate in animal experiments the bioavailability of one of the therapeutically active substance classes of *Ginkgo biloba*, the flavonoids, both in plasma and in CNS.

## EINLEITUNG

Die Verwendung von *Ginkgo biloba* als Heilmittel geht auf das vorchristliche China zurück. Während damals eine Reihe von Erkrankungen, wie z.B. Asthma, Bronchitis, Erfrierungen, Gonorrhöe oder Hautkrankheiten mit *Ginkgo biloba* Samen und/oder Blättern behandelt wurden, werden in der modernen rationalen Phytotherapie standardisierte Trockenextrakte aus *Ginkgo biloba* Blättern als Antidementiva zur Behandlung von frühen Stadien der Alzheimer Demenz (AD) oder der vaskulären Demenz eingesetzt. Wegen ihrer nachgewiesenen klinischen Wirksamkeit nahm die Weltgesundheitsorganisation (WHO) standardisierte *Ginkgo biloba* Extrakte, wie z.B. EGb 761, als Antidementiva in das anatomisch-therapeutisch-chemischen- (ATC) - Klassifikationssystem auf. Diese standardisierten Extrakte zeichnen sich durch einen klar definierten Wirkstoffgehalt aus: 22-27% Ginkgoflavonoide (berechnet als Ginkgoflavonglykoside); 5-7% Terpenlaktone (welche zu 2,8-3,4% aus Ginkgoliden A, B, C und zu 2,6-3,2% aus Bilobalid bestehen); sowie weniger als 5 ppm Ginkgolsäuren.

In den meisten veröffentlichten präklinischen und klinischen Untersuchungen wurde der standardisierte Extrakt EGb 761 verwendet. In vielen Ländern werden Fertigarzneimittel, die auf auf EGb 761 basieren, als verschreibungspflichtige Arzneimittel vertrieben. In Europa zählen diese Präparate zu den umsatzstärksten pflanzlichen Arzneimitteln.

In einer großen Anzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien wurden einige potentielle Wirkmechanismen für EGb 761 bzw. dessen Inhaltsstoffe erforscht. Unter anderem besitzt der Extrakt antioxidative Eigenschaften, die der Substanzklasse der Flavonoide zugeschrieben werden und die zur Vermeidung von Apoptose beitragen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Zellen vor oxydativem Stress und dessen Konsequenzen, wie z.B. der Peroxidation von Membranen, geschützt werden. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass EGb 761 die Expression einiger Proteine der Atmungskette beeinflusst und damit die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien verbessert. Außerdem konnte in zahlreichen klinischen Studien die Wirksamkeit von EGb 761 auf das Zentralnervensystem (ZNS) nachgewiesen werden (DeFeudis and Drieu, 2000; Ramassamy et al., 2007b).

Wie bereits erwähnt, wurde festgestellt, dass es sich bei den pharmakologisch aktiven Bestandteilen der Ginkgoextrakte um Flavonolglykoside und Terpenlaktone handelt.

Bisher liegen nur sehr begrenzte Informationen bezüglich der Bioverfügbarkeit von Flavonoiden und Terpenlaktonen vor. Paulke et al. (2006) gelang der Nachweis von Flavonoidmetaboliten im Gehirn von Ratten nach der oralen Gabe von Johanniskrautextrakt oder Quercetinglykosiden. Allerdings ist wenig bekannt über die Bioverfügbarkeit der Flavonoide und der Terpenlaktone aus *Ginkgo biloba* bzw. deren Metaboliten, die nach der oralen Verabreichung von EGb 761 gebildet werden. Moreau et al. (1986) untersuchten in einem Rattenexperiment die Absorption des mit  $^{14}\text{C}$  radioaktiv markierten Extraktes aus Ginkgoblättern und konnten sowohl im Plasma als auch in verschiedenen Geweben Radioaktivität nachweisen. Allerdings erlaubt diese relativ unspezifische Methode keine qualitative Aussage über die Art der Extraktbestandteile, die im Plasma und im Gewebe gefunden wurden. Ebenso kann die Quantität dieser Substanzen nicht abgeschätzt werden.

In dieser Arbeit wird die Entwicklung, Validierung und Anwendung einer analytischen Methode gezeigt, die es erstmals ermöglichte, die Flavonoide aus *Ginkgo biloba* bzw. deren Metaboliten mit hinreichender Empfindlichkeit im ZNS von Ratten zu bestimmen. Damit war es möglich, im Rahmen eines Tierversuches, die Flavonoide in relevanten Konzentrationen im Gehirn nachzuweisen und damit zu beweisen, dass sie in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

## INTRODUCTION

The use of *Ginkgo biloba* as a remedy goes back to pre-Christian China. At that time a number of diseases, such as asthma, bronchitis, frostbite, gonorrhoea or skin diseases, were treated with *Ginkgo biloba* seeds and/or leaves. However, in modern rational phytotherapy standardized herbal extracts from *Ginkgo biloba* leaves are used as antidementive drugs for the treatment of early stages of Alzheimer's dementia or vascular dementia. Due to its clinical efficacy, standardized extracts, like EGb 761, were acknowledged by the World Health Organization as antidementive drugs and have been listed in the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC)-Classification System. These standardized extracts are characterized by a clearly defined active agent content of: 22-27% Ginkgo flavonoids (calculated as Ginkgo flavone glycosides); 5-7% terpene lactones (consisting of 2.8-3.4% ginkgolides A, B, C and 2.6-3.2% bilobalide); and less than 5 ppm ginkgolic acids.

In most of the published preclinical and clinical investigations the standardized extract of Ginkgo leaves *EGb 761* was used. In many countries products containing EGb 761 are sold as a prescription drug. In Europe, these products belong to the most widely sold phytomedicines.

In a large number of *in vitro* and *in vivo* studies some potential action mechanisms for EGb 761 or its constituents were investigated. Among others, the extract possesses antioxidant properties, which are attributed to the flavonoid group and help to prevent apoptosis. This happens possibly through the protection of the cells against oxidative stress and its consequences, such as membrane peroxidation. Moreover, it was discovered that EGb 761 influences the expression of some proteins of the respiratory chain and consequently helps to improve the respiration mechanisms and the utilization of adenosine triphosphate (ATP) in the mitochondria. Numerous clinical studies support the efficacy of EGb 761 on the central nervous system (DeFeudis and Drieu, 2000; Ramassamy et al., 2007b).

As previously mentioned, the constituents of Ginkgo extracts found to be pharmacologically active were the flavonol glycosides and the terpene lactones. So far, very limited information about the brain bioavailability of flavonoids and terpene lactones is available. Paulke et al. (2006) could detect flavonoid metabolites in the brain of rats

after oral administration of *St. John's wort extract* or quercetin glycosides. However, very little is known about the brain bioavailability of the flavonoids and the terpene lactones from *Ginkgo biloba* and about the metabolites that are formed after the oral administration of EGb 761. Moreau et al. (1986) studied the absorption of the radioactive  $^{14}\text{C}$  marked extract prepared from Ginkgo leaves in a rat model and observed radioactivity both in plasma and several tissues. However, this relatively nonspecific method does not allow qualitative statements about the type of extract components which were found in plasma and tissues. Similarly, the quantity of these substances could not be assessed.

This work describes the development, validation and application of an analytical method, which makes it possible for the first time to determine the flavonoids from *Ginkgo biloba* and their metabolites with reasonable sensitivity in the brain of rats. Thus, it was possible in the context of an animal experiment to detect the flavonoids in brain at relevant concentrations and show that they are able to cross the blood-brain barrier.

*Ginkgo biloba*

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

*Ist es ein lebendig Wesen,  
Das sich in sich selbst getrennt ?  
Sind es zwei, die sich erlesen,  
Dass man sie als eines kennt ?*

*Solche Frage zu erwidern,  
Fand ich wohl den rechten Sinn;  
Fühlst du nicht an meinen Liedern,  
Dass ich eins und doppelt bin ?*

*Johann Wolfgang von Goethe*



# 1. ALLGEMEINER TEIL

## 1.1. Ginkgo biloba

### 1.1.1. Herkunft

Ginkgo (*Ginkgo biloba*) ist aus heutiger Sicht ein *lebendes Fossil*, dessen Ursprünge viele Millionen Jahre zurück in die Vergangenheit reichen und dessen nähere Verwandten bereits alle ausgestorben sind. Heute ist durch zahlreiche fossile Funde bekannt, dass Ginkgogewächse bereits in der Zeit des Unterperms (vor ca. 300 Millionen Jahren) existierten. Seine Blütezeit erlebte der Ginkgo von der Trias bis zur Kreide. Vor ca. 150 Millionen Jahren hat es nach heutigen Erkenntnissen noch mehrere Arten von Ginkgogewächsen gegeben. Im Laufe der Evolution zog sich der Ginkgo immer weiter nach Südostasien zurück, wo er auch Eiszeiten überlebte. Ende des 17. Jahrhunderts wurde er durch den deutschen Arzt Engelbert Kaempfer, der in Japan unterwegs war, über Utrecht in Holland wieder zurück nach Europa gebracht. Kämpfer beschrieb den Baum in seinem Buch „*Amoenitatum Exoticarum*“ im Jahre 1712. Seitdem wird der Ginkgo wieder in Europa kultiviert.

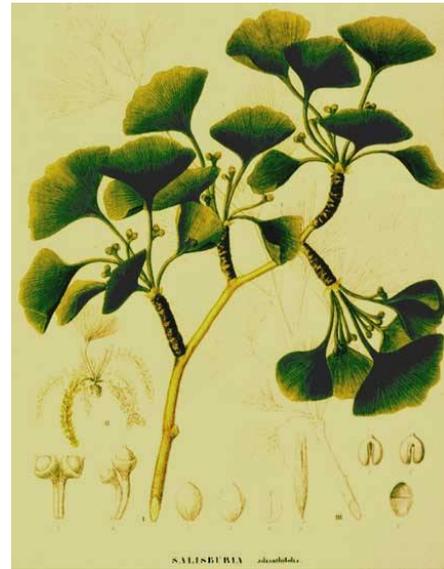


Abbildung 1. Männlicher und weiblicher Ginkgo-Trieb aus „*Flora Japonica*“ von Siebold & Zuccarini, Leiden 1835/42.



Abbildung 2. Ginkgofossil.

In China, Korea und Japan wird von Ginkgobäumen mit einem Alter von mehr als 1000 Jahren, einem Stammumfang von 10-20 Metern und einer Gesamthöhe von bis zu 40-50 Metern berichtet (Schulz and Hänsel, 2004).

Seit ältester Zeit wird Ginkgo aufgrund seiner Samen als Tempelbaum kultiviert. Heutzutage kommt er nur noch in China wildwachsend in der Natur vor,

ist aber als Zierbaum überall in den gemäßigten Breiten zu finden und hat sich in den Städten als sehr widerstandsfähig gegen Luftverschmutzung erwiesen (Hänsel and Sticher, 2004), so dass er häufig in Gartenanlagen, Alleen und Parks zu finden ist.

Bei Ginkgo handelt es sich um eine der am besten untersuchten und erforschten Arzneipflanzen der Gegenwart. Als belegte Indikationen gelten hirnorganische Leistungsstörungen in Form von beginnender Alzheimer-Demenz, Tinnitus und Schwindel. Darüber hinaus verbessert er die rheologischen Eigenschaften des Blutes und führt zur Hemmung des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF). Für die Klasse der Flavonoide wird außerdem von einer Inaktivierung toxischer Sauerstoffradikale berichtet. Aufgrund der o.g. Wirkungen ist der Umsatz mit Ginkgopräparaten und –produkten in Deutschland und Europa nicht zu unterschätzen. Dieser betrug 2006 in Europa immerhin 10,8 Millionen Euro (Schwabe and Pfaffrath, 2008).

Es befinden sich Arzneimittel und Nahrungsergänzungsmittel aus Ginkgo mit sehr unterschiedlicher Zusammensetzung und rechtlicher Zulassung auf dem Markt: von Arzneimitteln, die aufgrund klinischer Studien ihre Zulassung erhalten haben, über „traditionell angewendete“ Produkte, die nach §109a AMG zugelassen sind, bis hin zu Nahrungsergänzungsmitteln, die lediglich der Nahrungsmittelverordnung unterliegen. Alle diese verschiedenen Produkte können in Apotheken, Supermärkten und im Internetversandhandel erworben werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind ausschließlich Arzneimittel, die aufgrund klinisch belegter Wirksamkeit ihre Zulassung erhalten haben.

### **1.1.2. Botanik**

*Ginkgo biloba* ist der letzte lebende Vertreter der im Mesozoikum weltweit verbreiteten Klasse der Ginkgopsida (Ginkgoataer). *Biloba* heißt zweilappig (lat. *bi* = zweifach, gr. *lobós* = Lappen) und bezieht sich auf die Blattspreite (Genaust, 2005). Über die Ranghöhe des Taxons (Gruppe von Individuen, die gegen andere Gruppen abgegrenzt ist) gibt es, je nach morphologischen und molekularen Merkmalen, unterschiedliche Auffassungen (Reinhard, 2001; Sitte et al., 2002; Heß, 2005). Für ein Beispiel der vollständigen Klassifikation siehe Tabelle 1.

Tabelle 1. Ginkgo Systematik

Taxonomische Kategorie	Taxon
Reich/Domäne	Eucarya (echten Pflanzen)
Unterreich	Chlorobionta (Grünpflanzen)
Abteilung	Spermatophyta (Samenpflanzen)
Unterabteilung	Gymnospermae (Nacktsamer)
Klasse	Ginkgopsida
Unterklasse	Ginkgoidae
Überordnung	Ginkgoanae
Ordnung	Ginkgoales (Ginkgoartige)
Familie	Ginkgoaceae (Ginkgogewächse)
Gattung	Ginkgo
Art	biloba
Wissenschaftlicher Name	Ginkgo biloba L.

Der Ginkgobaum gehört zu der Unterabteilung der Gymnospermae (Nacktsamer), die einem paraphyletischen Taxon entsprechen, welches Pflanzen zusammenfasst, die zwar Samen hervorbringen, diese aber nicht mit einer Frucht schützend umhüllen (Heß, 2005). Die Herkunft des Wortes Ginkgo ist nicht genau bekannt. Wahrscheinlich hat es seinen Ursprung in dem Begriff, der in Japan bzw. China gebräuchlich ist: jap. ギンキョウ *Ginkyō* (heutige Schreibweise イチヨウ *ichō*), chinesisch 銀杏, Yín Xìng „Silberne Aprikose“.

Ginkgo ist ein zweihäusiger (diözischer), sommergrüner Baum, d.h., es gibt weibliche und männliche Pflanzen, die im Herbst ihre Blätter abwerfen (s. Abbildungen 3-Abbildung 3-A und 3-B). Junge Ginkgobäume haben eine schmale Krone, die jedoch bei älteren Exemplaren breiter wird. Die Möglichkeit, sich fortzupflanzen, erreicht der Ginkgo erst in einem Alter von 20 bis 30 Jahren (Strasburger et al., 1983). Besonders auffällig sind die im rechten Winkel von der Hauptachse abgehenden, gestauchten Kurztriebe, an denen sich Ende April bis Anfang Mai Blätter und Blüten entwickeln (s. Abbildung 3-C).

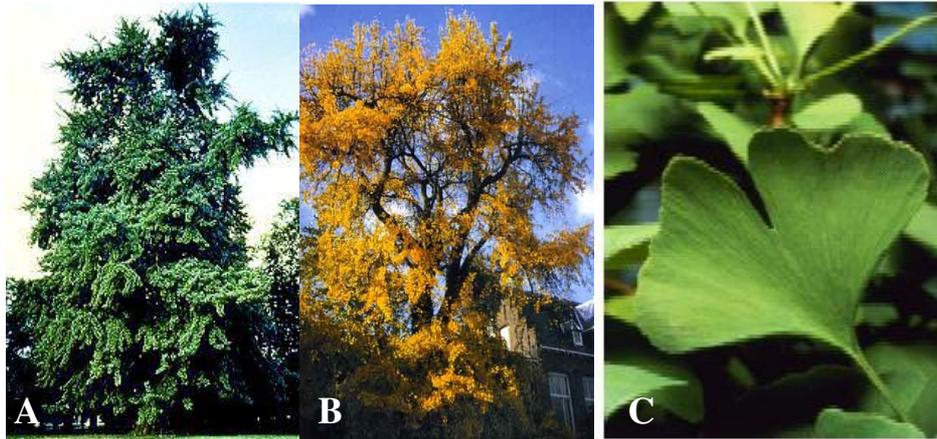


Abbildung 3. Ginkgobaum im Sommer (A) und Winter (B); Ginkgoblatt (C)

Die Blätter des Ginkgobaums weisen eine charakteristische Form auf. Sie sind lang gestielt, fächerförmig bis zweilappig und werden von strahlig verlaufenden, gabelig verzweigten Nerven (Dichotomie) durchzogen. Diese intensiv grünen, zur Zeit der Herbstfärbung leuchtend goldgelben Blätter sind kahl, schwach bewachst und unterschiedlich groß. Die Blätter können sowohl in ihrer Breite als auch Fläche variieren. Während die männlichen Blütenstände Haselnusskätzchen (s. Abbildung 4-A) ähneln, sitzen die weiblichen Blüten (s. Abbildung 4-B) terminal mit zwei Samenanlagen auf einem langen Stiel. Allerdings entwickelt sich jeweils nur eine Anlage zum Samen (Juretzek and Müller, 2002).



Abbildung 4. Weibliche (A) und männliche (B) Ginkgoblüten.

Nach erfolgreicher Befruchtung entstehen an den weiblichen Bäumen zahlreiche, rundliche, mirabellenähnliche gelbe Samen (s. Abbildung 5-A). Die reifen Samen beinhalten ein Embryo und ein Integument, das aus einer äußeren, dickfleischig-weichen Schicht (Sarcotesta) und einer inneren versteinerten, weißlichen, zwei- oder dreikantigen Sklerotesta besteht. Die Sklerotesta wird wegen ihrer Analogie mit Steinfrüchten oft auch „Steinkern“ genannt (s. Abbildung 5-B). Beim Verfaulen der pflaumenartigen Früchte

tritt häufig ein sehr unangenehmer Geruch auf, der auf einen hohen Anteil an Butter-, Valerian- und Capronsäure zurückzuführen ist. Dies führt dazu, dass überwiegend männliche Bäume durch Stecklinge vermehrt und in den Gartenanlagen angepflanzt werden.

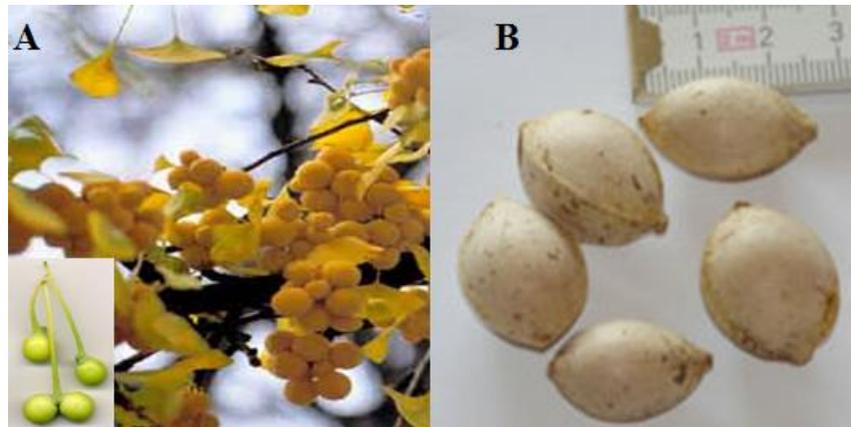


Abbildung 5. Ginkgofrüchte (A) und -samen (B).

### ***1.1.3. Droge und Inhaltsstoffe***

Als arzneilich genutzte Droge für die Herstellung standardisierter Extrakte werden die grünen, noch nicht gelb verfärbten Blätter von Ginkgo verwendet. Der heute hohe Bedarf an der Ginkgodroge wird durch Plantagen in Frankreich und den USA gesichert.

Die in Ginkgo vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sind heute weitgehend bekannt. Es handelt sich um eine Vielzahl von polaren und apolaren Substanzen, die aus den Blättern von Ginkgo isoliert wurden. Hauptinhaltsstoffe der Droge *Ginkgo folium* sind, nach der WHO Monographie (Kommission-E, 1994):

- ▲ 0,5-2% Flavonoide; nach dem Europäischen Arzneibuch (EAB, 2006) mindestens 0,5%
- ▲ 0,06-0,23% Ginkgolide
- ▲ 0,26% Bilobalid

Weiterhin enthalten Ginkgoblätter Sesquiterpene, Steroide, Benzenoide, Karotinoide, Phenylpropanole und Kohlenhydrate. Nicht-glykosidische Biflavone, Catechin und Proanthocyanidine sind auch vorhanden.

Nachfolgend werden die wichtigsten pharmakologischen Inhaltsstoffe beschrieben.

### 1.1.3.1. Flavonoide

Flavonoide gehören zu einer Gruppe von sekundären pflanzlichen Inhaltsstoffen, die in der Natur sehr weit verbreitet sind. Die Bezeichnung *Flavonoide* leitet sich von dem lateinischen Wort „flavus“ (gelb) ab, welche darauf zurückzuführen ist, dass diese Substanzen häufig eine gelbe Farbe besitzen.

Ginkgo verfügt über hohe Konzentrationen an Flavonoiden, darunter Flavonolglykoside, acylierte Flavonolglykoside, Biflavonoide, Flavan-3-ole bzw. Proanthocyanidine.

Als Aglyka der Flavon- und Flavonolglykoside kommen in erster Linie Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin vor. Bis heute wurden annähernd 40 verschiedene flavonoidartige Substanzen in Ginkgo nachgewiesen. Unter diesen identifizierten Verbindungen sind Mono-, Di- und Triglykoside von Flavonolen mit den Hauptvertretern Kämpferolrutinosid, Isoquercetinrutinosid und Quercetinrutinosid (Rutosid) sowie Zimtsäureester von Flavonolglykosiden mit den Hauptkomponenten 6'''-Cumaroyl-kämpferolrutinosid und 6'''-Cumaroylrutosid (Smith and Luo, 2004). Die Strukturen der wichtigsten Flavonoidverbindungen aus *Ginkgo biloba* sind in Abbildung 6 aufgeführt.

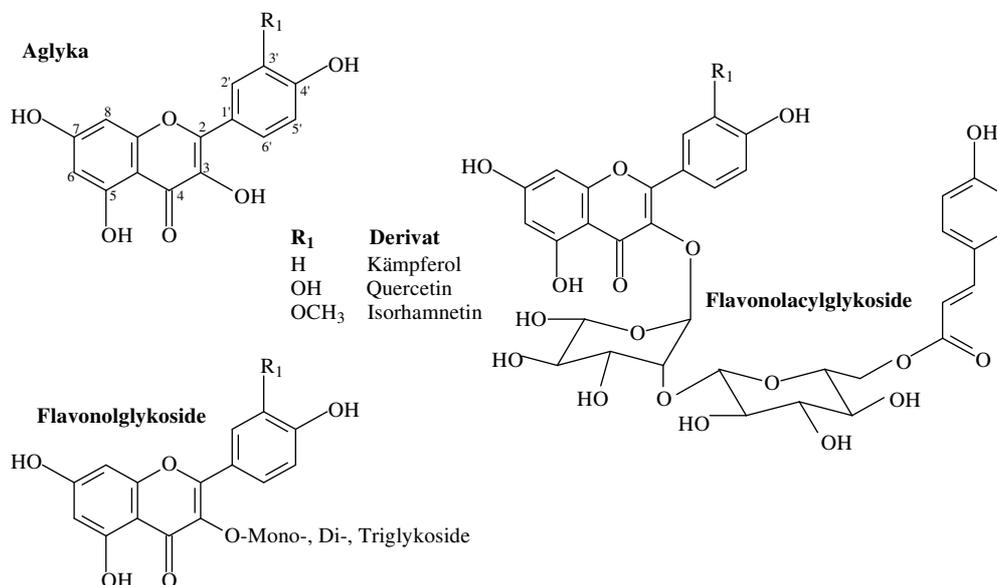
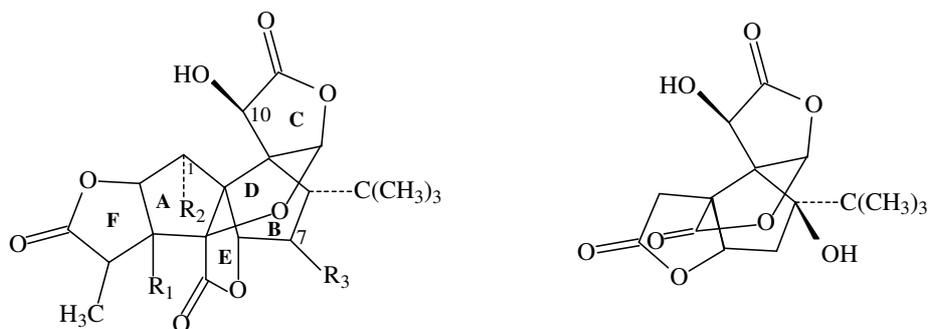


Abbildung 6. Flavonoide in *Ginkgo biloba* L.

Außerdem enthalten die Blätter Biflavone, vor allem Sciadopitysin, Ginkgetin und Iso-ginkgetin (Rimpler, 1999).

### 1.1.3.2. Terpenoide

Eine weitere Klasse sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in Ginkgo stellen die Isoprene dar. Hierzu zählen Steroide und Terpene, wobei sechs verschiedene terpenoide Verbindungen aus Ginkgo bekannt sind: die Diterpenverbindungen Ginkgolid A, B, C, J und M und das Sesquiterpen Bilobalid (s. Abbildung 7).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Ginkgolid
OH	H	H	A
OH	OH	OH	B
OH	OH	OH	C
OH	H	OH	J
H	OH	OH	M

**Bilobalid**

Abbildung 7. Terpenlaktone aus *Ginkgo biloba* L.

Die Ginkgolide A, B, C, J und M gehören zu einem ungewöhnlichen, auf einem Spirobicyclononan-Grundgerüst basierenden Typ von Diterpenen, der bisher nur in Ginkgo nachgewiesen wurde. Ginkgolid M kommt allerdings nur in der Wurzel vor (Nakanishi, 2005; Bolshakov et al., 2006). Das Molekülgerüst baut sich aus mehreren, fünfgliedrigen Ringen auf, die dreidimensional zu stabilen, im Fall der Ginkgolide, zu käfigartigen Strukturen kondensiert sind. Ring A und die drei sauerstoffhaltigen Ringe C, D und F umschließen einen Hohlraum, in dem Kationen oder Molekülteile geeigneter Größe eingelagert und durch multidentate Wechselwirkung mit den Sauerstoffatomen, die den Hohlraum umgeben, gebunden werden können (Hänsel and Sticher, 2004).

Ein weiteres Terpen ist das Bilobalid. Diese Verbindung zählt zu den Sesquiterpenen. Ihre Struktur zeigt noch die Verwandtschaft zu den Ginkgoliden. Biogenetisch handelt es sich um ein Abbauprodukt der Ginkgolide, das wahrscheinlich durch Abspaltung von vier Kohlenstoffatomen aus den Ringen F und A sowie einem Kohlenstoffatom aus dem

Ring E entstanden ist und daher als Pentanoditerpen einzuordnen ist (Rimpler, 1999). Es enthält ebenfalls drei Laktonringe und eine tertiäre Butylgruppe.

### **1.1.3.3. Andere Inhaltsstoffe**

Neben den bereits genannten Hauptinhaltsstoffen kommen weitere Substanzen in Ginkgoblättern vor.

Ginkgolsäuren und andere, ähnlich aufgebaute Polyketide, sind in den fleischigen äußeren Teilen der Samenschale (Sarcotesta) und in geringer Konzentration auch in den Blättern vorhanden; weiterhin kommen alycyclische Säuren, Cyclite, Kohlenhydrate und ihre Derivate sowie Shikimisäure, Chinasäure, Ascorbinsäure und Zuckersäure vor. Pinit, Sequoyit und Saccharose stellen genauso weitere in Ginkgo vorhandene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dar wie die langkettigen Kohlenwasserstoffe und Derivate, Alkohole, Aldehyde (z.B. 2-Hexanal, Blattaldehyd), Ketone und Säuren. Ferner findet man u.a. Substanzen wie (Z, Z)-4,4'-(1,4-Pentadien-1,5-diyl) diphenol, 6-Hydroxykynurensäure, Cytokinine und  $\beta$ -Lectine,

## **1.2. Standardisierte Extrakte**

Ginkgo wird therapeutisch in Form eines Trockenextraktes eingesetzt, d.h. einer Mischung aus verschiedenen in Ginkgo vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit bei klinischen Studien und der therapeutischen Anwendung ist eine qualitative und quantitative Standardisierung des Ginkgoextraktes in Bezug auf bestimmte Inhaltsstoffe erforderlich.

Nach Angaben des Deutschen Arzneibuches (DAB, 2006) und des Europäischen Arzneibuches (EAB, 2006) müssen Ginkgotrockenextrakte aus getrockneten und zerkleinerten Ginkgoblättern unter Verwendung von Aceton 60% (m/m) und einem mehrstufigen Extraktionsverfahren hergestellt werden. Hierbei müssen die in der Monographie Extrakte (Extracta) für die Erstellung von Trockenextrakten beschriebenen Verfahrenswesen eingehalten werden.

Als Arzneistoffe werden laut Monographie der Kommission E (publiziert im Bundesanzeiger Nr. 133 vom 19.07.1994) nur noch Spezialextrakte akzeptiert, die als Wirkstoff einen Trockenextrakt enthalten, der ein Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) von 35-67 zu

1 (Mittelwert 50:1) aufweist und durch Extraktion mit Aceton 60% und nachfolgenden Reinigungsschritten ohne Zumischung von Konzentraten oder isolierten Inhaltsstoffen hergestellt wurde. Derartige Spezialextrakte gewährleisten einen Gehalt von 22-27% Flavonoidglykoside berechnet als Flavonoidglykoside mit einer mittleren Molmasse von Mr 756,7 sowie mindestens 5 und höchstens 7 Prozent Terpenlaktone (davon 2,8 bis 3,4% als Ginkgolide A, B und C und 2,6 bis 3,2% als Bilobalid). Weitere Inhaltsstoffe der Spezialextrakte sind z.B. Hydroxykynurensäure, Shikimisäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure und Parahydroxybenzoesäure.

Durch diese speziellen Herstellungsverfahren werden Stoffe in den Spezialextrakten eliminiert, welche u.a. die Stabilität beeinträchtigen oder die wegen ihrer toxischen Eigenschaften entfernt werden sollten. Entfernt werden im wesentlichen Fette, Wachse, Tannine, Proanthocyanidine, Biflavone, Ginkgole, Ginkgolsäure, Proteine und mineralische Bestandteile.

Insbesondere für Ginkgolsäuren konnte gezeigt werden, dass sie ein allergenes, zytotoxisches, mutagenes und tumorpromovierendes Potenzial aufweisen (Hausen, 1998; Siegers, 1999; Koch et al., 2000; Westendorf and Regan, 2000; Ahlemeyer et al., 2001; Baron-Ruppert and Luepke, 2001). Die für die Arzneimittelherstellung verwendeten Extrakte haben einen Gehalt von < 5ppm Ginkgolsäuren.

Nur die standardisierten Extrakte „EGb 761“ und „LI 1370“ erfüllen die o.g. Kriterien.

## **1.3. Anwendungen**

### ***1.3.1. Historische Anwendung***

Der Einsatz von Ginkgopräparaten für medizinische Zwecke reicht mehr als 5.000 Jahre in die Ursprünge der traditionellen chinesischen Medizin zurück. Zunächst wurden die Früchte oder Samen („Bai-guo“) des Ginkobaumes für den therapeutischen Einsatz verwendet. Dieser erste medizinische Einsatz wurde während der Yuan Dynastie (1280-1368) in Li Tung Wan's Werk „Shi Wu Ben Cao“ (Essbare Pflanzen) und in Wu-rui's Werk „Ri Yong Ben Cao“ (Pflanzen des täglichen Gebrauchs) schriftlich belegt (De-Feudis, 2003). Die Samen wurden zur Behandlung von Erkrankungen wie Asthma, chronischer Bronchitis, Tuberkulose und Harnfluss verwendet. Eine Einnahme der Blät-

ter zu medizinischen Zwecken wurde erstmals in einem Text von Liu Wen-Tai, „Ben Cao Pin Hue Jing Yaor“ in 1505 beschrieben (Zimmermann et al., 2002). Jedoch sind die *Ginkgo biloba* Blätter erst seit kurzem in den chinesischen Arzneibüchern zur Behandlung von Herz- und Lungenerkrankungen zu finden (DeFeudis, 2003).

Für keine der zahlreichen Wirkungen und Indikationen, welche über die Jahrhunderte beschrieben wurden, gibt es klinische Belege. Deshalb sind sie nach den Regeln einer rationalen Phytotherapie nicht von wissenschaftlicher Bedeutung.

### ***1.3.2. Aktuelle Anwendung***

Ginkgo wird heutzutage nicht nur in der traditionellen Medizin, sondern auch als Arzneipflanze in Fertigarzneimitteln der Schulmedizin, die auf pharmakologischen Untersuchungen und klinischen Studien basieren, angewendet. Bei der therapeutischen Anwendung von Ginkgo ist es in diesem Kontext wichtig, grundsätzlich zu unterscheiden zwischen den traditionellen Therapiemethoden, die nur auf Erfahrungswissen beruhen, und der Schulmedizin, die durch wissenschaftliche Forschungen und Studien gestützt und belegt wird.

Folgende Gruppen von Ginkgopräparaten müssen aus wissenschaftlicher und rechtlicher Sicht unterschieden werden:

- ▲ Rationale Phytopharmaka (zugelassen nach Abs. 2. Und 3 des Arzneimittelgesetzes (AMG))
- ▲ Traditionell angewendete Präparate (Zulassung nach §109a des AMG)
- ▲ Homöopathische Präparate
- ▲ Nahrungsergänzungsmittel

#### *Rationale Phytopharmaka*

In Europa, besonders in Deutschland und Frankreich, existiert ein großer Markt für rationale Phytopharmaka, die als Wirkstoff einen Trockenextrakt aus Ginkgo besitzen. Weiterhin lässt sich die Bedeutung von Ginkgoprodukten dadurch erkennen, dass diese Arzneipflanze bzw. deren Spezialextrakt vor einigen Jahren in der von der WHO neu geschaffenen Gruppe *Antidementiva* des ATC-Index unter dem Code N06D gelistet wurde. Weiterhin enthält die Rote Liste 2007 in der Hauptgruppe *Antidementiva*

(*Nootropika*) 19 allopathische und apothekenpflichtige Ginkgopräparate, die in festen und flüssigen Darreichungsformen angeboten werden. Die einzigen monografiekonformen Ginkgopräparate, die dem aktuellen Wissensstand in Bezug auf klinische Studien entsprechen, sind als Monopräparate im Handel. Eine sinnvolle Kombination mit Extrakten anderer Arzneipflanzen konnte bisher nicht gezeigt werden. Wie in Abbildung 8 und dem Anhang veranschaulicht, werden diese Präparate auch in unterschiedlichen Extrakt dosierungen angeboten. Hinsichtlich ihrer Wirkstoffspezifikation entsprechen alle Präparate den Vorgaben der Monographie der Kommission E von 1994 (BfArM, 1994).



Abbildung 8. Auswahl von verschiedenen rationalen Ginkgophytopharmaka.

Das Interesse am therapeutischen Einsatz von Ginkgo wurde ursprünglich ausgelöst durch den EGb 761 Extrakt von Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel (Karlsruhe, Deutschland). EGb 761 wird in Europa seit Anfang der 90er Jahre unter dem Handelsnamen „Tebonin“ als Phytopharmakon angeboten. Im Gegensatz dazu sind in den USA Produkte, die EGb 761 enthalten, durch die US-Zulassungsbehörde FDA nur als Nahrungsergänzungsmittel und nicht als Arzneimittel zugelassen. Die französische Firma Beaufour-Ipsen und ihre deutsche Tochtergesellschaft Ipsen Pharma produzierten EGb

761 und vermarkten es als Tanakan und Rökan. Inzwischen gibt es mit LI 1370 einen weiteren Spezialextrakt, der unter dem Handelsnamen Kaveri auf dem Markt ist.

Alle diese Präparate enthalten als Wirkstoff den in Abschnitt 1.2 beschriebenen Spezialtrockenextrakt mit einem Droge-Extrakt-Verhältnis von 35-67:1.

Die Monographie der Kommission E (1994) erkennt für die definierten Spezialextrakte (EGb 761 und LI 1370) folgende Anwendungsgebiete an :

- ▲ Zur symptomatischen Behandlung von hirnganisch bedingten Leistungsstörungen im Rahmen eines therapeutischen Gesamtkonzeptes bei demenziellen Syndromen mit Leitsymptomatik, d.h. Gedächtnisstörungen, Konzentrationsstörungen, depressive Verstimmung, Schwindel, Ohrensausen oder Kopfschmerzen. Zur primären Zielgruppe gehören demenzielle Syndrome bei primär degenerativer Demenz, vaskulärer Demenz und Mischformen aus beiden.
- ▲ Zur Verbesserung der schmerzfreien Gehstrecke bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit der Stadien IIa bis IIb nach Fontaine (Claudicatio intermittens) im Rahmen von physikalisch-therapeutischen Maßnahmen, insbesondere Gehtraining.
- ▲ Schwindel und Tinnitus begründet auf vaskulärer und involutiver Genese.

#### *Traditionell angewendete Präparate*

Es gibt auf dem Markt einige traditionell angewendete Ginkgopräparate, deren Indikation und Wirksamkeit auf jahrelanger Beobachtung beruhen. Zu diesen Präparaten liegen keine Studiendaten vor und somit ist nach den Regeln der Evidence-based-Medicine keine Wirksamkeit zu erwarten. Eine Vergleichbarkeit mit den Phytopharmaka, die aufgrund von positiven Studienergebnissen zugelassen sind, ist daher keinesfalls möglich. Schon allein aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung und Dosierung der Extrakte.

Traditionell angewendete Präparate müssen lediglich bestimmte Qualitätskriterien erfüllen und nach AMG §109a entsprechend gekennzeichnet sein. Die Richtlinie 2004/24/EG der Kommission E (2004) bezeichnet diese Produkte ebenfalls als traditionelle pflanzliche Arzneimittel.

Laut § 109a Abs. 3 des AMG muss auf der Verpackung traditionell angewandter Arzneimittel, eine oder mehrere der folgenden Deklarationen angegeben sein:

„Traditionell angewendet

- ...als mild wirkendes Arzneimittel...“
- ...zur Stärkung oder Kräftigung...“
- ...zur Besserung des Befindens...“
- ...zur Unterstützung der Organfunktion...“
- ...zur Vorbeugung..., usw.“

Ein Beispiel für solche Ginkgopräparate ist *Ginkgo 405 Duopharm* (s. Abbildung 9). Dieses Präparat in Drageeform wird laut Verpackung „zur Förderung der Durchblutung und Kräftigung des Adernsystems“ eingesetzt. Weiterhin enthält es einen Extrakt, welcher nicht die Anforderungen der Kommission E erfüllt. Der Extrakt wird mit 30% bzw. 96% Ethanol (V/V) als Auszugsmittel hergestellt und enthält 10% Flavonoidglykoside; das Droge-Extrakt-Verhältnis entspricht 9-11:1.



Abbildung 9. Traditionell angewendetes Ginkgopräparat.

#### *Homöopathische Präparate*

Nach dem AMG ist ein homöopathisches Arzneimittel ein Arzneimittel, das nach einem homöopathischen Zubereitungsverfahren hergestellt wurde, welches im Europäischen Arzneibuch oder - falls dort nicht vorhanden - in den offiziell gebräuchlichen Pharmakopöen der Mitgliedstaaten der EU verzeichnet ist. Ein homöopathisches Arzneimittel kann auch mehrere Wirkstoffe enthalten. Zwar sind einige Präparate aus Ginkgo als homöopathische Arzneimittel registriert, wie z.B. Ginkgo biloba Hevert (s. Abbildung 10), aber es wird - wie auch bei anderen Homöopathika und Drogen - keine Angabe über eine therapeutischen Indikation gemacht. Allerdings sind diese Präparate mit den o.g. pflanzlichen Arzneimitteln nicht vergleichbar und vereinbar und werden deshalb nicht weiter betrachtet.



Abbildung 10. Homöopathisches Ginkgopräparat.

### Nahrungsergänzungsmittel

Weltweit sind zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel mit Ginkgo als vermeintlich wirksamen Bestandteil auf dem Markt, die jedoch häufig nur eine mangelhafte Qualität aufweisen. Im Besonderen ist dies in den USA zu sehen, wo Ginkgo-Produkte nicht als Arzneimittel zugelassen sind, sondern nur als Nahrungsergänzungsmittel akzeptiert werden. Hieraus resultieren andere Regularien für die Überwachung dieser Produkte. Auch in Deutschland werden Ginkgo-Produkte, wie z.B. die in Abbildung 11 dargestellten, als Nahrungsergänzungsmittel angeboten, bei denen eine physiologische Wirkung nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Deshalb ist bei vielen dieser Produkte unklar, wie hoch das potentielle Gesundheitsrisiko ist.



Abbildung 11. Beispiele für Ginkgo-Nahrungsergänzungsmittel.

In der EU werden Ginkgo-Produkte rechtlich durch die Richtlinie 2002/46/EG reguliert. Gemäß der geltenden *Nahrungsergänzungsmittel-Verordnung* ist ein Nahrungsergänzungsmittel „ein Lebensmittel, welches

- ▲ dazu bestimmt ist, die allgemeine Ernährung zu ergänzen,
- ▲ ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung darstellt und
- ▲ in dosierter Form, insbesondere in Form von Kapseln, Pastillen, Tabletten, Pillen, Brausetabletten und anderen ähnlichen Darreichungsformen, Pulverbeuteln, Flüssigampullen, Flaschen mit Tropfeinsätzen und ähnlichen Darreichungsformen von Flüssigkeiten und Pulvern zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen in den Verkehr gebracht wird.“

In Deutschland werden Ginkgo-Produkte zusätzlich zum Arzneimittelbereich auch als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Obwohl solche Mittel physiologische Wirkungen

verursachen können, ist ihr Verkauf auch ohne umfassende Erforschung ihrer Wirksamkeit oder Unbedenklichkeit möglich. Deshalb ist für viele von diesen Produkten sowohl die Qualität als auch die Unbedenklichkeit unklar und nicht gewährleistet.

Die mangelhafte Qualität dieser Ginkgoprodukte wurde unter anderem auch in einer Untersuchung des Zentrallaboratoriums Deutscher Apotheker aufgezeigt, in der nachgewiesen wurde, dass einige der untersuchten Präparate nicht die Kriterien der Kommission E erfüllten und aus diesem Grund nicht als Fertigarzneimittel betrachtet werden sollen.

Zwar enthalten diese Nahrungsergänzungsmittel Ginkgoblätter oder Ginkgoextrakte (EGb), unterscheiden sich aber bezüglich des „Wirkstoffes“ (=Extrakt, der hierbei den Wirkstoff darstellt), gravierend von Ginkgopräparaten, die als Arzneimittel zugelassen sind (Meins et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass diese Produkte unzulässig hohe Mengen an Ginkgolsäure beinhalten, was für die Patienten ein Gesundheitsrisiko mit sich bringt. Laut der E-Monographie der Kommission, sollte der zulässige Höchstwert von 5 ppm nicht überschritten werden. Da bei einigen dieser Produkte zwar in der Werbung, nicht jedoch auf der Packung, auf die zugelassene Indikation von Fertigarzneimittel aus Ginkgo hingewiesen wird, könnten Patienten irrtümlich annehmen, dass die Wirkung von entsprechenden Nahrungsergänzungsmitteln den Fertigarzneimitteln vergleichbar wäre.

Aussagen in der Produktwerbung von Nahrungsergänzungsmitteln werden seit dem 1. Juli 2007 durch die neue Gesundheitsverordnung 1924/2006 (Europäische-Union, 2007) geregelt. Krankheitsbezogene Aussagen und Indikationen sind, wie für andere Lebensmittel auch, nicht zulässig.

## **1.4. Pharmakokinetik**

Die Pharmakokinetik der Ginkgo-Inhaltstoffe wurde sowohl in Tier- als auch in Humanstudien untersucht.

Moreau et al. (1986) verabreichten bei der Durchführung ihrer Tierstudie einen radioaktiv markierten, standardisierten Extrakt EGb 761 p.o. an Ratten, wobei eine Absorptionsrate von 60% bestimmt wurde. Da schon nach 1,5 Stunden spezifische Radioaktivität im Blut festgestellt wurde, wurde davon ausgegangen, dass die Resorption im oberen Magen-Darm-Trakt stattfindet. Die glandulären und neuronalen Gewebe bzw. die Augen zeigten eine hohe Affinität zu den markierten Inhaltsstoffen des verabreichten Extraktes. Die Eliminationshalbwertszeit des markierten Extraktes betrug etwa 4,5 Stunden. Nach 72 Stunden waren 22% der Radioaktivität im Urin und 29% in den Fäzes.

Nachfolgend wird auf weitere Untersuchungen eingegangen, bei denen bestimmte Flavonoide oder Terpenoide verabreicht wurden.

### ***1.4.1. Terpenoide***

Zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit der Terpene aus Ginkgo (Ginkgolide und Bilobalid) wurde eine Humanstudie mit 12 Probanden durchgeführt (KG =  $59 \pm 9$  kg). Die Auswertung der Plasmaproben wurde mittels einer GC/MS-Analytikmethode ermittelt (Fourtillan et al., 1995). Nach der oralen und intravenösen Verabreichung von EGb 761 stellten Fourtillan et al. die absolute Bioverfügbarkeit von 80%, 88% und 79% für Ginkgolid A (GA), Ginkgolid B (GB) und Bilobalid (Bb) fest. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese drei Terpenlaktone, die nicht metabolisiert werden, fast vollständig absorbiert werden (Fourtillan et al., 1995).

Darüber hinaus wurde auch die Pharmakokinetik untersucht. Die maximalen Plasmakonzentrationen wurden innerhalb von 1 bis 2 Stunden erreicht und betragen 33,3, 16,5 und 18,81 ng/mL für GA, GB und Bb (s. Abbildung 12). Die entsprechenden Eliminationshalbwertszeiten betragen 4,5, 10,5 und 3,2 Stunden und die Urinausscheidungen beliefen sich auf 72,3%, 41,4% und 31,2% der oralen verabreichten Dosis. Die Zugabe von Nahrungsmittel führte zu keiner Veränderung der pharmakokinetischen Parameter.

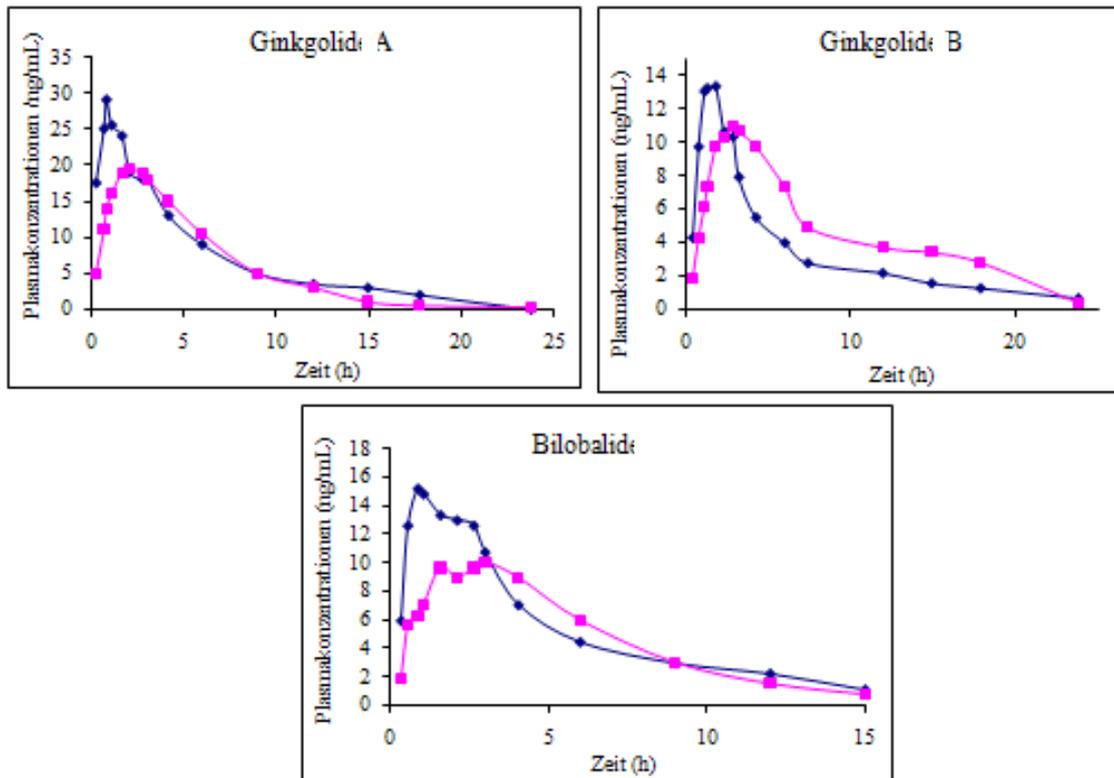


Abbildung 12. Konzentrations-Zeit-Verlauf im Plasma von Terpenoiden nach einmaliger Gabe von 1,44, 1,03 und 3,36 mg von Ginkgolid A, Ginkgolid B und Bilobalid an Menschen (Fourtillan et al., 1995).

Es wurde beobachtet, dass Bb in biologischen Proben (Plasma, Urin, Fäzes) instabil war, da in neutralen oder alkalischen Medien die laktonische Gruppe durch eine irreversible Hydrolyse gespalten wird. Im Gegensatz dazu werden GA und GB durch eine Säuerung des Milieus laktonisiert (Fourtillan et al., 1995).

In einer weiteren Studie wurde die Bioverfügbarkeit der Terpenoide aus EGb 761 an Ratten untersucht. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mittels einer GC/MS-Analytik in Anlehnung an die Methode von Fourtillan (Biber and Koch, 1999). In diesem Fall wurden den Tieren auch verschiedene Dosierungen von EGb 761 (30, 55 und 100 mg/kg KG) p.o. verabreicht. Die Pharmakokinetik war für alle drei Terpenlaktone (GA, GB und Bb) linear. Die maximalen Plasmakonzentrationen wurden für die drei untersuchten Substanzen innerhalb von einer Stunde erreicht und die Halbwertzeiten ( $t_{1/2}$ ) betrugen zwischen 1,7 und 3 Stunden.

Bei der Untersuchung der Pharmakokinetik bei älteren Menschen (67-89 Jahre, n=12) nach einfacher und mehrfacher Gabe von EGb 761 (Biber, 2003) wurden bis auf die Clearance keine Unterschiede festgestellt. Im Vergleich zu jungen und gesunden Pro-

banden, waren die Clearance-Werte etwas niedriger. Dies war aber zu erwarten, da die Clearance im Laufe des Lebens in der Regel abnimmt.

Weitere Untersuchungen haben die Bioverfügbarkeit von GA, GB und Bb durch HPLC/APCI bestätigt (Mauri et al., 2001). Wie auch schon in den oben aufgeführten Studien zu beobachten war, konnte auch kein Ginkgolid C nachgewiesen werden. In einer neuen Studie haben Mauri et al. (2006) die Bioverfügbarkeit von GA, GB und Bb durch HPLC/APCI bestätigt und festgestellt, dass die Abwesenheit von Ginkgolid C in Plasmaproben tierischer und menschlicher Herkunft auf seine schnelle Methylierung zurückzuführen ist.

Die Bioverfügbarkeit von Ginkgolid C ist bis jetzt nicht ausführlich untersucht. In den oben aufgeführten Studien, die bis 2006 durchgeführt wurden, konnte kein Ginkgolid C in Plasmaproben nachgewiesen werden. Mauri et al. (2006) vermuten, dass die Abwesenheit von Ginkgolid C in Plasmaproben tierischer und menschlicher Herkunft auf eine schnelle Methylierung zurückzuführen ist. In einer neuen Studie wurde jedoch die Bioverfügbarkeit vom Ginkgolid C nach intravenöser Gabe an Ratten festgestellt (Xie et al., 2008). Die orale Bioverfügbarkeit und damit die pharmakologische Relevanz von Ginkgolid C bleiben trotzdem offen.

#### **1.4.2. Flavonoide**

Fast alle Flavonoide, die in EGb 761 enthalten sind, kommen in Form von Flavonol- und Acylglykosiden vor und haben eine oder mehrere Zuckerreste (Hasler et al., 1992; Tang et al., 2001). Die zugehörigen Aglyka sind Quercetin, Kämpferol oder Isorhamnetin (s. Abschnitt 1.1.3.1 Flavonoide). Die glykosidischen Reste befinden sich in den Positionen 3' und 4'. Bei den Kohlenhydratmolekülen handelt es sich in der Regel um Einheiten von L-Rhamnose, D-Glucose oder Glukorhamnose.

In einer Rattenstudie konnten nach der Verabreichung von 300 mg/kg EGb 761 die Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin im Plasma nachgewiesen (Watanabe et al., 2001) und somit die Bioverfügbarkeit von den Flavonolglykosiden belegt werden. Ferner wurde eine humane Studie durchgeführt, bei der die drei o.g. Aglyka im Urin an drei Probanden bestimmt wurden (Drieu, 1986). Weiterhin wurden die pharmakokinetischen Parameter der Aglyka in zwei Pilotstudien untersucht: eine vorläufige Studie mit

zwei gesunden Freiwilligen und eine Bioäquivalenzstudie mit 18 gesunden Probanden (Nieder, 1991; Wojcicki et al., 1995).

Da es sich bei Quercetin um den häufigsten Vertreter der Flavonoide handelt, wurden seine Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit sowie sein Metabolismus vielfach untersucht. U.a. wurde Quercetin in verschiedenen Studien als reine Substanz oder aus verschiedenen pflanzlichen Quellen, u.a. aus Zwiebeln, Äpfeln und EGb 761, verabreicht. Dazu zählen Rattenstudien (Pietta et al., 1995; Manach et al., 1996; Abrahamse et al., 2005), Schweinestudien (Cermak et al., 2003) und Humanstudien (Hollman and Katan, 1997; Pietta et al., 1997; Erlund et al., 2000; Graefe et al., 2001; Williamson and Manach, 2005).

Die Mechanismen, die für die Absorption und den Metabolismus von Flavonoidglykosiden verantwortlich sind (s. Abbildung 13), wurden zwar in Ratten und Menschen untersucht, sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt und werden immer noch wissenschaftlich diskutiert.

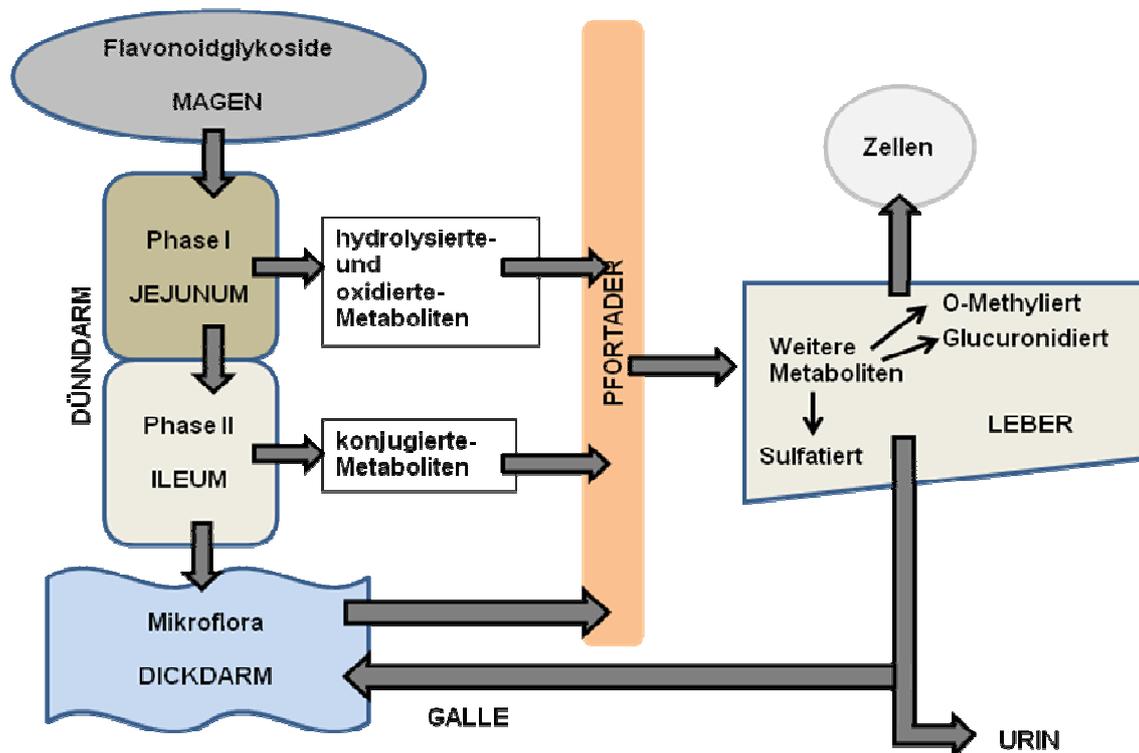


Abbildung 13. Möglicher Metabolismus von Flavonoiden.

Vor der Resorption werden die Flavonolglykoside durch Hydrolyse im Dünndarm deglykosidiert (Crespy et al., 1999; Wolfram et al., 2002; Spencer et al., 2003). Danach

können verschiedene Konjugationsschritte durch Enzyme stattfinden (Phase II-Reaktionen), so dass glucuronidierte, sulfatierte und methylierte Derivate aus Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin entstehen. Ein besonderer Nachweis liegt über den ausführlichen Metabolismus der Phase-I-Deglykosilierung und Phase-II vor, der durch UDP-glucuronosyltransferasen, Sulphotransferasen und Catechol-O-Methyltransferasen erfolgte (Shali et al., 1991; Spencer et al., 1999; O'Leary et al., 2003). Als nächster Schritt werden die erzeugten Metaboliten resorbiert. Dies kann mittels passiver Diffusion durch die Enterozytenmembran oder durch Aufnahme über einen aktiven Transporter geschehen (Ader et al., 2000; Cermak et al., 2003). Als Folge dieses Metabolismus befinden sich im Blut keine der im Extrakt enthaltenen Flavonolglykosiden, sondern ein Gemisch von glukuronidierten, sulfatierten und methylierten Derivaten aus Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin. Anschließend können weitere Metabolismusschritte in der Leber erfolgen (Hollman and Katan, 1997; Oliveira et al., 2002). Flavonoide, die im Dünndarm nicht resorbiert werden, und jene, die von der Galle abgegeben werden, werden im Dickdarm durch Mikroorganismen zu verschiedenen Benzo- oder Phenolsäuren umgewandelt. Diese werden anschließend weiter absorbiert oder mit dem Urin eliminiert (Pietta et al., 1997).

Fast alle Flavonoide, die im Plasma und Urin vorkommen, liegen glucuronidiert, sulfatiert oder als Methylderivate vor (Watson and Oliveira, 1999; Day et al., 2001). Als Ergebnis des Stoffwechsels sind keine von den ursprünglichen Flavonoylglykosiden und kein oder nur ganz wenig Quercetin *in vivo* zu finden (Ader et al., 2000; Erlund et al., 2000; Graefe et al., 2001; Cermak et al., 2003). Die durch die verschiedenen Stoffwechselwege entstehenden Metaboliten erreichen anschließend die verschiedenen Gewebe bzw. Zellen und sind dort für die zelluläre Wirkung verantwortlich.

### **1.5. Wirksamkeit von Ginkgo bei Hirnleistungsstörungen**

Es gibt eine Reihe von Studien über die Wirksamkeit von EGb 761 bei Hirnleistungsstörungen wie der Alzheimer Demenz, die in verschiedenen Publikationen zusammengefasst sind (Ahlemeyer and Krieglstein, 2003b; Smith and Luo, 2004; Ramassamy et al., 2007a). Einige davon belegen die klinische Wirksamkeit von EGb 761, während andere die dazu gehörigen möglichen Mechanismen pharmakologisch *in vitro* und *in vivo* erklären. Diese Studien wurden zum überwiegenden Teil mit dem Ginkgoextrakt EGb 761 durchgeführt. Ebenfalls gut dokumentiert sind Untersuchungen mit dem Extrakt LI 1370.

Die durch standardisierte Spezialextrakte nachgewiesenen Wirkungen, umfassen neuroprotektive und durchblutungsfördernde Effekte, die Steigerung der Gedächtnisleistungen und des Lernvermögens sowie eine bessere Kompensation von Gleichgewichtsstörungen. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die für diese Wirkungen verantwortlich sind, noch nicht vollständig geklärt.

Zu den pharmakologischen Wirkungen von Ginkgoextrakten liegen über 300 Originalpublikationen vor. Tierexperimentell wurden bei Ginkgoextrakten bisher folgende Wirkungen nachgewiesen: PAF-Antagonismus, Beeinflussung des zentralen cholinergen Systems, Verringerung altersbedingter Defizite der Neurotransmission, Verbesserung von Gedächtnisleistung und Lernvermögen, Neuroprotektion durch Membranprotektion, Steigerung der Hypoxietoleranz, antiischämische Eigenschaften, Hemmung des Hirnödems, Schutz vor Läsion zerebraler Strukturen und Hemmung von Apoptose. Zusätzlich gibt es auch Belege für Radikalfängereigenschaften sowie hämodynamische, vaskuläre und hämorheologische Eigenschaften.

Die Frage, welche Inhaltsstoffe oder Inhaltsstoffklassen an der neuroprotektiven Wirkung von EGb 761 beteiligt sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Wie bei anderen Phytopharmaka ist auch bei Ginkgoextrakten davon auszugehen, dass die Gesamtwirkung des Extraktes aus einem synergistischen Zusammenwirken verschiedener Inhaltsstoffe resultiert. Einzelnen Inhaltsstoffgruppen aus dem Ginkgoextrakt lassen sich allerdings bestimmte pharmakologische Wirkungen zuordnen. Nach heutigem Kenntnisstand sind es vor allem die Terpenlaktone (Ginkgolide und Bilobalid) und die Flavonoide (Quercetin-, Kämpferol- und Isorhamnetin-Derivate) mit ihren konkreten Eigen-

schaften, die für die polyvalente Wirkung von Ginkgo verantwortlich sind. Nachfolgend wird auf die verschiedenen Eigenschaften im Einzelnen eingegangen.

### 1.5.1. Terpenoide

Die Terpenoide hemmen verschiedenen Enzyme, was den Anstieg von Botenstoffen bewirkt. Es kommt demnach zu Wirkungen, die als Membran- und Gewebssprotektion sowie als Vasoregulation beschrieben werden können.

#### Plättchenaktivierender Faktor

Der Plättchenaktivierende Faktor-Rezeptor (PAFR) ist Mitglied der G-Proteingekoppelten-Rezeptor-Familie. Diese Rezeptoren wurden in einer Reihe von Zellen und Geweben nachgewiesen (Doly et al., 1987), u.a. im ZNS. Einige Studien (MacLennan et al., 1996; Smith et al., 1996; Bazan et al., 2002) deuten darauf hin, dass der PAFR ein Target für die Verlangsamung der Progression von neurodegenerativen Erkrankungen sein könnte, daher spielt dieser Rezeptor bei der Aufklärung der Auswirkungen der Terpenlaktone in der Neuromodulation eine bedeutende Rolle.

Das Bilobalid und die Ginkgolide, vor allem GB und GC, sind Antagonisten des PAFRs (Braquet, 1986). *In vitro* Studien belegen z.B., dass Bilobalid den stärksten Antagonismus am klonierten PAFR aufweist (Stromgaard et al., 2002), gefolgt von GB, das eine ca. 25-fach höhere Potenz als GC zeigt (Vogensen et al., 2003). Abbildung 14 zeigt eine Zusammenfassung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Ginkgolide und des PAFR (Stromgaard and Nakanishi, 2004).

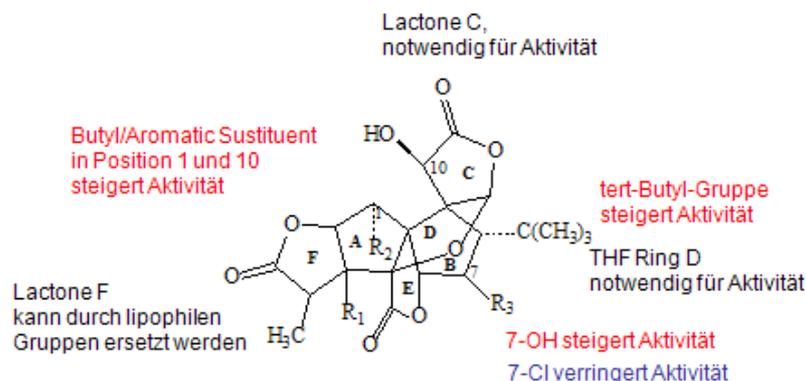


Abbildung 14. Struktur-Wirkungs-Beziehung von Ginkgoliden und PAFR.

Der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) ist andererseits ein nativer Phospholipid-Agonist und potenter Bioregulator, der in den Zellmembranen von Säugern als Reaktion auf verschiedenartige Reize hin biosynthetisiert wird und dadurch unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Reaktionen in Gang bringt. Er löst die Blutplättchenaggregation aus und spielt eine entscheidende Rolle als Mediator allergischer Entzündungen. Da die Ginkgolide die Anzahl und Aggregation der Thrombozyten reduzieren (Lamant et al., 1987), können sie die Blutzirkulation und damit die Gabe von Glukose und Sauerstoff im Gehirn nach einer Ischämie verbessern. Der PAF spielt auch eine Rolle in der Modulation verschiedener Prozesse im ZNS und peripherer Prozesse, u.a. bei der Modulation der Langzeit-Potenzierung an den Synapsen, der Erhöhung der intrazellulären Ca-Ionenkonzentration und bei der Genexpression. Die genauen Mechanismen, durch die der PAF im ZNS seine Wirkung vermittelt, sind weiterhin unklar.

#### *Glycin-Rezeptor*

Studien zeigen, dass die Ginkgolide, vor allem GA und GC, potente und selektive Antagonisten der Glycin-Rezeptoren (GlyR) sind (Chatterjee et al., 2003; Kondratskaya et al., 2005). Diese Rezeptoren befinden sich hauptsächlich im Rückenmark und Hirnstamm, aber auch in den höheren Regionen des Gehirns, wie dem Hippocampus. Zusammen mit den  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (GABA, aus Gamma-aminobutyric acid), sind sie die wichtigsten hemmenden Rezeptoren im ZNS. GlyR gehören, zusammen mit nicotinischen Acetylcholin und Serotonin-Rezeptoren, zu einer Superfamilie von Membran-Rezeptoren, welche die schnelle Übertragung von chemischen Signalen im ZNS ermöglichen. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass GB die GlyR sowohl im Hippocampus als auch in neokortikalen Zellen antagonisiert (Kondratskaya et al., 2002; Ivic et al., 2003). Ein High-Throughput-Screening-Test (Jaracz et al., 2004) zeigte, dass es sich bei Ginkgolid C um den stärksten Ligand des GlyR handelte und dass jede Manipulation der Hydroxyl-Gruppe zu einem Verlust der Aktivität auf  $\alpha$ 1-GlyR führte.

#### *Benzodiazepin Rezeptor*

Benzodiazepin bindet nicht nur den GABA-Rezeptor im ZNS (zentraler Benzodiazepin-Rezeptor), sondern auch Rezeptoren im peripheren Gewebe und Gliazellen im Hirn. Diese Rezeptoren sind die peripheren Benzodiazepin-Rezeptoren (PBR), auch Translo-

cator Protein (TSPO) genannt. PBR ist ein Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Cholesterin-Transportes. Seine Funktion ist nicht vollständig geklärt, aber er kann bei Steroidogenesis, Zellproliferation sowie Stress und Apoptose eine Rolle spielen. Die Wirkung bei Apoptose stützt sich auf die Erhöhung der Anzahl von PBR in bestimmten Hirnregionen bei neurodegenerativen Erkrankungen und nach Hirnschädigungen (Gavish et al., 1999).

Mehrere Studien haben zusätzlich gezeigt, dass die Ginkgolide, insbesondere GA und GB, die Ligandbindung-Kapazität sowie die Protein- und mRNA-Expression der mitochondrialen PBR im adrenalen Cortex *in vivo* verringern (Amri et al., 1996; Amri et al., 1997). Dies wiederum führt zu einer verminderten Corticosteron-Plasmakonzentration. Darüber hinaus deuten die o.g. Untersuchungen darauf hin, dass die neuroprotektive Wirkung von GA und GB durch ihre Auswirkung auf die Glukokortikoid-Biosynthese erklärt werden könnte (Stromgaard and Nakanishi, 2004).

Neuere Studien zeigen, dass GB hauptsächlich die Expression der PBR hemmt, welche durch die Bindung an einen Transkriptions-Faktor vermittelt wird. Deshalb wird vermutet, dass GB die überschüssige Glucocorticoid-Bildung durch PBR-kontrollierte Steroidogenesis reguliert (Amri et al., 2002; Amri et al., 2003).

Die oben dargestellten Wechselwirkungen von Ginkgoliden mit PAFR, GlyR und PBRs sind die am besten beschriebenen Interaktionen von Ginkgoliden mit Targets im ZNS.

Mehrere Studien haben zusätzlich gezeigt, dass die Ginkgolide gegen verschiedene ZNS-Schäden, wie Ischämie sowie zerebrovaskuläres und Schädel-Hirn-Trauma, aber auch vor Entzündungen schützen (MacLennan et al., 2002). Es ist anzunehmen, dass GB die post-ischemische Produktion von freien Sauerstoff-Radikalen vermindert (Pietri et al., 1997). Außerdem hat sich gezeigt, dass GA und GB Glutamat-induzierte Schäden von Hippocampuszellen verringert (Prehn and Kriegstein, 1993).

Einer weiteren Untersuchung zufolge schützt GB vor dem Rückgang der CaMKII-Aktivität (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase-II) nach zerebraler Ischämie (Zalawska et al., 1996). Da man davon ausgeht, dass sich CaMKII an der Langzeit-Potenzierung beteiligt, könnte dies eine Erklärung für die Wirkung der Ginkgolide in

der Neuromodulation sein. Weiterhin wurde gezeigt, dass GA und GB die Menge von potenziellen zytotoxischen Stickstoffmonoxiden verringern, die von der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) produziert werden. Diese Eigenschaft wurde auch bei Bilobalid nachgewiesen (Cheung et al., 1999; Sharma et al., 2000; Cheung et al., 2001).

#### *Die Rolle des Bilobalids*

In Bezug auf Bilobalid zeigen verschiedene Studien, dass sich das Sesquiterpentrilakton an der neuroprotektiven Wirkung von EGb 761 durch verschiedene Mechanismen beteiligt. U.a. kann Bilobalid die mitochondriale Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese beeinflussen, Apoptose hemmen, gegen Membranschädigung schützen und die Genexpression in den Mitochondrien beeinflussen (Bruno et al., 1993; DeFeudis and Drieu, 2000; DeFeudis, 2002; Chandrasekaran et al., 2003; Klein et al., 2003).

Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Effekte des Bilobalids, die der Ödembildung und der Ischämie entgegenwirken, auf den Schutz vor Hypoxie-Schäden in Zellmembranen zurück zu führen sind. Es ist bekannt, dass hypoxische Gewebe über die aktive Rolle des Endothels entzündliche Reaktionen verursachen können, die zu Gewebeschädigungen führen. Eine Studie zeigte z.B., dass unter induziertem Hypoxia das ATP-Niveau von humanen Endothelzellen (HUVEC - human umbilical vein endothelial cells) abnimmt (Janssens et al., 1995). Diese ATP-Abnahme wurde durch EGb 761 und besonders durch Bilobalid vermindert.

Unter hypoxischen/hypoglykämischen Bedingungen konnte die Freisetzung von Glutamat in kortikalen Hirnschnitten von Ratten durch Bilobalide deutlich reduziert werden. Dies deutet darauf hin, dass die neuroprotektive Wirkung von Bilobalid durch den verminderten Efflux von Glutamat und damit die Exitotoxizität verursacht werden könnte (Johns et al., 2002). Darüber hinaus wurde auch der durch Glutamat-induzierte Zelltod von Rattenneuronenkulturen gezeigt (Chandrasekaran et al., 2002).

Eine weitere Studie zeigte, dass die mitochondriale Atmungskettenaktivität durch Bilobalid geschützt wird (Janssens et al., 1999). Die dazu gehörenden molekularen Mechanismen sind bis dato nicht bekannt, aber sie könnten in der Beeinflussung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in der Atmungskette von Mitochondrien auf Ebene der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und der Cytochrome c Oxidase (Komplex III)

liegen (Janssens et al., 2000; Tendi et al., 2002). Dies liegt daran, dass sich unter Ischämie die Aktivität dieser zwei Enzymkomplexe verringert.

### ***1.5.2. Flavonoide***

Wie bei den Terpenlaktonen, wurden auch die pharmakologischen Mechanismen der Flavonoide von EGb 761 in mehreren Studien untersucht.

Der Körper produziert während des normalen Stoffwechselprozesses und bei externen Schäden freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies. Diese Moleküle verursachen verschiedene Prozesse, wie die Lipidperoxidation und Schäden in Membranen und Geweben, und führen letztendlich zum Zelltod. Unter normalen Bedingungen ist der Körper in der Lage, diesen schädlichen Mechanismen entgegenzuwirken. Sie umfassen Enzyme wie Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (CAT), Glutathion Peroxidase (GPx) und Glutathion Reductase (GR), aber auch nicht-enzymatische Moleküle wie Glutathione, Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol. Die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kann jedoch zu einer Überforderung der körpereigenen Entgiftungssysteme führen. Im Tiermodell konnte eine Unterstützung der Entgiftungssysteme durch Flavonoide nachgewiesen werden, d.h., es konnte gezeigt werden, dass EGb-Phytosomen die Aktivität von SOD im Cortex, Kleinhirn und Striatum sowie CAT und GB im Cortex und Hippocampus steigern und zudem die GPx-Aktivität im Striatum erhöhen (Naik et al., 2006; Ramassamy et al., 2007b).

In einer Reihe von Studien wird die Rolle der Flavonoide bei der Neuroprotektion dargestellt (Dajas et al., 2003; Ramassamy, 2006; Vafeiadou et al., 2007). Demnach ist die am besten beschriebene Wirkung der Flavonoide die Fähigkeit, direkt als Akzeptoren von freien Radikalen zu agieren. So werden die toxischen Sauerstoffradikale in erster Linie durch die in EGb 761 enthaltenen Ginkgoflavonoide inaktiviert (Joyeux et al., 1995).

Einer Untersuchung zufolge wird die synaptosomale Wiederaufnahme von Dopamin im Striatum und die von Serotonin im Cortex durch Flavonoide aus EGb 761 verringert, wenn ein peroxidatives Milieu vorliegt (Ramassamy et al., 1992).

Nach Chen et al., (1999) konnten die Flavonoidanteile von EGb 761 vor OH-radikal-induzierter-Apoptose in Körnerzellen vom Kleinhirn schützen. In einer nachfolgenden Studie (Xin et al., 2000) wurde ein Zusammenhang zwischen der o.g. OH-Radikal-induzierter-Apoptose, der Abnahme von bcl-2 mRNA sowie der Zunahme auf der Proteinebene des Transkriptionsfaktors AP-1, der aus dem Heterodymer Fos und Jun besteht, hergestellt. Einerseits verhindert die Protein bcl-2 die Apoptose und andererseits ist AP-1 in Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose involviert. Folglich könnten die Flavonoide von EGb 761 durch die Entkopplung dieser Signalkaskade die Neuronen vor Apoptose schützen.

Ein anderer Teil der antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide ist die Eigenschaft, mit Metallionen Komplexe zu bilden. Einige Studien haben ergeben, dass Quercetin hauptsächlich durch Chelatierung von Metall-Ionen und als Radikalfänger antioxidativ wirkt. Als Metallchelatoren spielen die Flavonoide eine wichtige Rolle in der Bioverfügbarkeit und Toxizität einer Vielzahl von Metallen. Die Komplexierung von Al (III) durch Quercetin reduziert z.B. die Überlastung mit Aluminium durch die Nahrung. Neurologischen Beschwerden und Knochenbeschwerden werden mitunter von Aluminium verursacht (Cornard and Merlin, 2002). EGb 761 erwies sich z.B. bei Aluminiumvergifteten Ratten als wirksam zur Verbesserung des räumlichen Lernens und der Gedächtnisleistung. Dieser Schutz scheint auf eine verringerte Expression von APP und Caspase-3 an Ratten zurückzuführen sein, die zum Rückgang in der Produktion unlöslicher A $\beta$ -Amyloid Fragmente führt (Gong et al., 2005). Quercetin ist auch ein Eisenchelator. Durch diese Eigenschaft kann es die Reaktion von Eisen mit reaktiven Sauerstoffspezies verhindern, welche zur Lipidperoxidation führt. Eine weitere Schutzmaßnahme von Quercetin kann die direkte Hemmung der Lipidperoxidation sein (Nijveldt et al., 2001).

Die Flavonoide von EGb 761 können das Stickstoffmonoxid (NO) durch zwei unterschiedliche Mechanismen regulieren, bei denen die Genexpression von verschiedenen Arten der Stickstoffmonoxid-Synthase eine Rolle spielt.

Die moderate Freisetzung von Stickstoffmonoxiden in Endothelzellen durch EGb 761 ist einerseits für die Erweiterung der Blutgefäße (Dilatation) und somit für die Blutversorgung von Organen wichtig (Chen et al., 1997; Cheung et al., 1999; Wu et al., 2007).

Die Regulierung erfolgt in diesem Fall durch endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die sich in den Endothelzellen befindet. *In vitro* konnte EGb 761 die Expression von eNOS erhöhen (Koltermann et al., 2007), hierdurch könnte zumindest teilweise die Wirkung des Extraktes bei peripherer Verschlusskrankheit erklärt werden.

Zum anderen erfolgt die Regulierung von NO durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivität (iNOS), die sich in Makrophagen und Mikrogliazellen befinden. In diesem Fall kann eine übermäßige Produktion von NO durch die iNOS in Makrophagen oder Mikrogliazellen zu Nebenwirkungen führen, z.B. oxidativen Schäden, die zur Neuroinflammation und letztendlich zum neuronalen Tod führen können. Es wurde gezeigt, dass Flavonoide von EGb 761 in der Lage sind z.B. Zellen im Hippocampus vor NO-induzierbarer-Toxizität zu schützen (Bastianetto et al., 2000). In dieser Studie wurde auch angedeutet, dass der Flavonoidanteil des Extraktes die Proteinkinase C durch Phospholipasen-A2 und -C reguliert. Diese Signal-Traduktion-Moleküle wurden alle durch Flavonoide reguliert.

Ein weiterer interessanter Effekt von Flavonoiden auf Enzymsysteme ist die Hemmung der Metabolisierung von Arachidonsäure. Dadurch können zum Teil Wirkungen verursacht werden, die Entzündungen und den trombogenischen Eigenschaften der Flavonoide entgegenwirken (Nijveldt et al., 2001; Kudolo et al., 2004).

Zusätzlich zu den o.g. bekannten Wirkungsmechanismen von Flavonoiden, gibt es neuere Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass Flavonoide auch durch andere Mechanismen neuroprotektiv wirken könnten (Luo, 2006; Ramassamy, 2006; Ramassamy et al., 2007b; Vafeiadou et al., 2007). Darin wird spekuliert, dass die antioxidative Aktivität nicht die einzige Erklärung für die Bioaktivität der Flavonoide bei *in vivo* Untersuchungen ist. Es wurde auch die Modulation von anderen intrazellulären Signalkaskaden diskutiert, welche das neuronale Überleben und die Differenzierung kontrollieren, sowie die Wirkung in der Genexpression und Wechselwirkungen mit Mitochondrien. Weiterhin können im Gehirn folgende Mechanismen stattfinden:

- ▲ Modulation intrazellulärer Signalkaskaden, z.B. die Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, neuronale Überleben und Kontrolle von Tod und Zelldifferenzierung.

- ▲ Beeinflussung von Genexpression (z.B. iNOS) und Interaktionen mit Mitochondrien.
- ▲ Modulation der Aktivität von pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie nuklearer Faktor-kappaB (NF-kappaB).
- ▲ Regulation der Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1beta (IL-1beta) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha).
- ▲ Hemmung der Aktivierung der NADPH-Oxidase und nachfolgenden Generation reaktiver Sauerstoffspezies.

#### *Pharmakologische Wirksamkeit bei Demenz*

Selbst unter Neurotransmittersubstitution entspricht das polyvalente Wirkprinzip des Ginkgoextraktes der Vielschichtigkeit der Pathogenese degenerativer Demenz mit der neuronalen Degeneration. Ginkgo wird deswegen zur Stabilisierung und zur Verbesserung kognitiver Funktionen bei Hirnleistungsstörungen wie vaskulärer Demenz und Morbus Alzheimer eingesetzt. Obwohl die Wirkungsmechanismen für EGb 761 im zentralen Nervensystem noch nicht vollständig geklärt sind, wird von synergistischen Effekten der Flavonoidfraktion, der Terpenlaktone und weiterer Inhaltsstoffe ausgegangen. Die postulierten Wirkmechanismen wurden in verschiedenen Übersichtsartikeln zusammengefasst (Ahlemeyer and Krieglstein, 2003a; Ahlemeyer and Krieglstein, 2003b; Christen, 2004; Ramassamy, 2006; Ramassamy et al., 2007b).

Neben den bereits beschriebenen pharmakologischen Wirkungen bei neurodegenerativen Krankheiten, wird die Wirksamkeit von EGb 761 durch verschiedene Mechanismen in neueren Studien belegt. Diese Mechanismen umfassen die Beeinflussung der cholinergen Neurotransmission und des APP-Metabolismus, der Regulation der Genexpression, den Schutz gegen Amyloid- $\beta$ -induzierte oxidative Schäden sowie Fibrillen-Bildung und Apoptose. Weiterhin reduziert EGb 761 die Amyloid- $\beta$  Produktion durch die Senkung des Cholesterinspiegels (Smith and Luo, 2004; Luo, 2006; Ramassamy et al., 2007b). Untersuchungen, welche die Funktionsweise von EGb 761 beim Schutz gegen die  $\beta$ -Amyloid-Peptid-induzierte Toxizität und gegen Schäden durch oxidativen Stress in Mitochondrien beleuchteten, erhielten viel Aufmerksamkeit.

Die o.g. Wirkungsmechanismen von Ginkgoextrakt bei Hirnleistungsstörungen sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

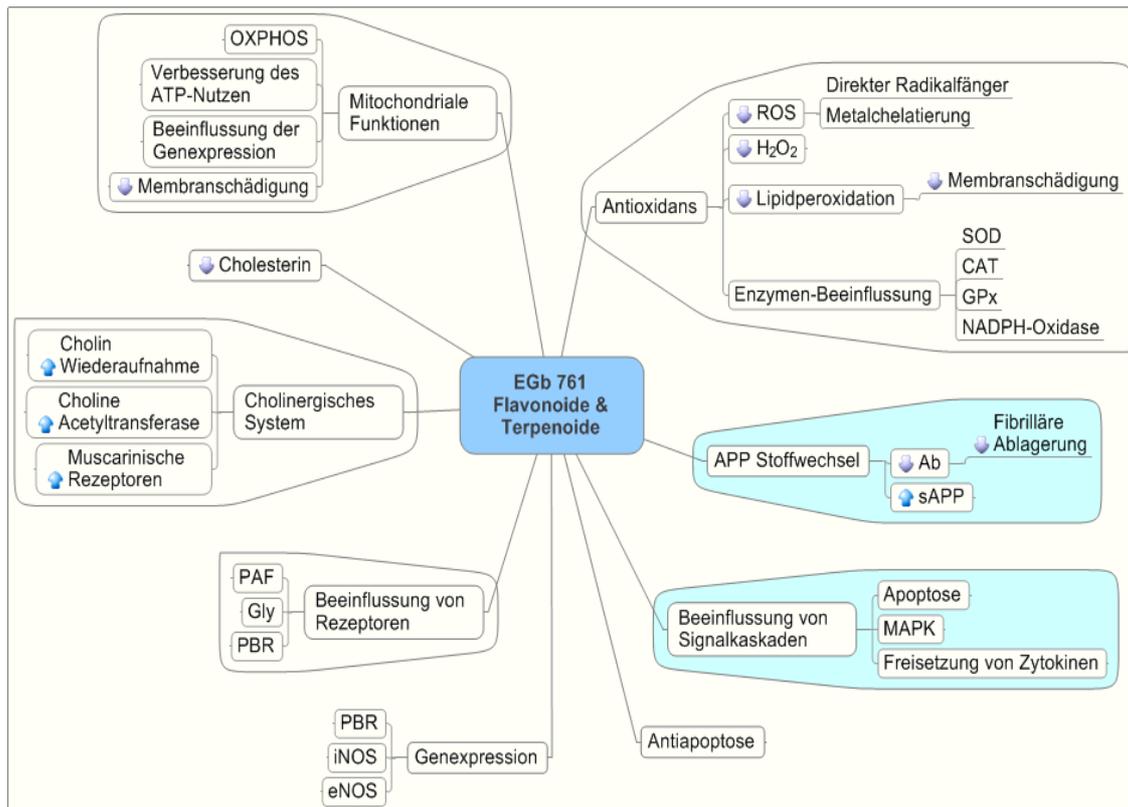


Abbildung 15. Verschiedene Wirkungsmechanismen von Ginkgoextrakt EGb 761.

### 1.5.3. Klinische Wirksamkeit

Bis dato wurden zahlreiche klinische Studien zu standardisiertem EGb veröffentlicht (Kleijnen and Knipschild, 1992a; Kleijnen and Knipschild, 1992b; DeFeudis and Drieu, 2000; Loew, 2002). Es wurden u.a. placebokontrollierte, doppelblinde und randomisierte Studien durchgeführt. In einem Großteil dieser Untersuchungen konnte bei Patienten, die eine Therapie mit EGb 761 erhielten, eine deutliche Verbesserung des Kurzzeitgedächtnisses und der geistigen Wachheit sowie bestimmte Testergebnisse, wie z.B. der Geriatric Clinical Evaluation Scale (GCES), festgestellt werden. Weiterhin konnte die Sicherheit und die therapeutische Wirksamkeit des Extraktes bei leichten bis moderaten Formen degenerativer Demenz des AD-Typs belegt werden (Smith and Luo, 2004; Ramassamy, 2006) und sehr positive Ergebnisse beim Rückgang von Schwindel, Kopfschmerzen und Tinnitus nachgewiesen werden.

Verschiedene Metaanalysen zeigen die Nützlichkeit der Langzeittherapie mit EGb 761 bei der Behandlung von bestimmten Störungen der zerebralen Funktion (einschließlich neurosensorischer und anderer Symptome) bei leichter bis moderater Demenz des Alz-

heimer-Typs und Multi-Infarkt (vaskuläre Demenz) sowie Mischformen aus beiden Typen (DeFeudis and Drieu, 2000).

Einige Untersuchungen zeigen widersprüchliche Ergebnisse. So kam eine Metaanalyse von vorliegenden Studienergebnissen z.B. zum Schluss, dass die Hinweise auf einen günstigen Einfluss von Ginkgopräparaten auf die kognitiven Fähigkeiten von Alzheimerpatienten unschlüssig und wenig überzeugend seien (Birks and Grimley Evans, 2007). In einer vorangegangenen Publikation hatten die gleichen Autoren Ginkgo noch als vielversprechend beschrieben (Birks et al., 2002).

Aufgrund dieser umstrittenen Ergebnisse über die Wirkung bei AD steht EGb 761 derzeit im Mittelpunkt zweier klinischer Phase-III-Studien, die jeweils mit 3.000 über 70-jährigen Testpersonen durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich um die „GEM“-Studie in den USA (Ginkgo Evaluation of Memory Studie) und die „GuidAge“-Studie in Frankreich. Beides sind placebokontrollierte, doppelblinde und randomisierte Untersuchungen mit Ginkgoextrakten, bei denen zweimal pro Tag eine Dosis von 120 mg EGb 761 verabreicht wird. Das Ziel ist dabei die Klärung der Frage, ob Ginkgo bei der Vorbeugung von Demenz, vor allem der Alzheimerkrankheit, bei normalen älteren Menschen oder frühen kognitiven Beeinträchtigungen wirksam ist. Die Ergebnisse werden im Jahr 2008 (USA) bzw. 2010 (Frankreich) erwartet (Vellas et al., 2006; CHS Coordinating Center 2008).

#### ***1.5.4. Nebenwirkungen und Interaktionen***

Auch wenn von einigen Nebenwirkungen wie Blutungen oder Hautreaktionen berichtet wurde, weisen verschiedene Toxizitätsstudien die Unbedenklichkeit des standardisierten Ginkgoextraktes nach (Mahadevan and Park, 2008). Da die Thrombozytenaggregation in klinisch relevantem Ausmaß durch EGb 761 gehemmt werden kann, soll Ginkgo nicht mit Antikoagulanzen kombiniert werden (Diamond et al., 2000). Es gibt einige Fallberichte über perioperative Blutungsneigung nach alleiniger Einnahme von Ginkgo (Hauser et al., 2002; Spolarich and Andrews, 2007). Aufgrund dieser pharmakokinetischen Daten und Konsensus-Meinung sollte eine Ginkgotherapie zwischen 36 Stunden und 14 Tagen vor einer Operation abgesetzt werden (Sierpina et al., 2003).

Für die akzeptierten Trockenextrakte sind die in Tabelle 2 erwähnten Vorsichtsmaßnahmen zu beachten (Rote Liste Service, 2007).

Tabelle 2. Vorsichtsmaßnahmen und Nebenwirkungen von Ginkgo.

Ginkgo-biloba-Blätter (Trockenextrakt)	
Gegenanzeigen	Kdr. < 12 J. (keine ausreichenden Untersuchungen)
Anwendungsbeschränkungen	Depressive Verstimmungen und Kopfschmerzen, die nicht im Zusammenhang mit demenziellen Syndromen auftreten (keine ausreichenden Untersuchungen)
Schwangerschaft	Strenge Indikationsstellung. Ausreichenden Erfahrungen über die Anwendung beim Menschen liegen nicht vor. Der Tierversuch erbrachte keine Hinweise auf embryotoxische/teratogene Wirkungen
Stillzeit	Strenge Indikationsstellung. Es ist nicht bekannt, ob Inhaltsstoffe des Extraktes in die Milch übergehen
Nebenwirkungen:	
<i>Haut</i>	Allergische Hautreaktionen (sehr selten) (s. Immunsystem)
<i>Nervensystem und Psyche</i>	Kopfschmerzen (sehr selten)
<i>Gastrointestinaltrakt</i>	Leichte Magen-Darm-Beschwerden (sehr selten)
<i>Gefäße</i>	Blutungen bei Langzeitanwendung (sehr selten, kausaler Zusammenhang nicht gesichert)
<i>Immunsystem</i>	Allergische Hautreaktionen (sehr selten)
<i>Wechselwirkungen</i>	AM, die die Blutgerinnung hemmen WW nicht auszuschließen
<i>Intoxikationen</i>	Symptome: verstärktes Auftreten von Nebenwirkungen
<i>Therapie</i>	Spezifische Gegenmittel sind nicht bekannt. Die Behandlung sollte in Abhängigkeit vom klinischen Bild erfolgen.

Für den Bereich medikamentöser Interaktionen von Ginkgo gibt es nur wenige Studien an Menschen (Kleinschmidt et al., 2007). Allerdings gibt es einige Tieruntersuchungen, welche die Modulation von Cytochrom-P450 durch standardisierte Ginkgoextrakte nachweisen.

Bilobalid war hierbei die Substanz, welche die CYP-Aktivität am meisten induzieren konnte (Umegaki et al., 2007). Einerseits induzierte der Ginkgoextrakt in der Leber von Ratten die Aktivität von CYP2B, CYP3A1 und CYP3A2 (Shinozuka et al., 2002; Umegaki et al., 2002). Andererseits konnte die Wirkung von Barbituraten in Ratten durch Ginkgo vermindert werden (Wada et al., 1993; Kubota et al., 2004; Chatterjee et al., 2005).

Eine andere *in vitro* Studie an Hepatozyten deutet darauf hin, dass der Ginkgoextrakt und die Flavonoidaglyka Isorhamnetin, Kämpferol und Quercetin, die *in-vitro*-

katalytische Aktivität der menschlichen CYP1B1, CYP1A1, und CYP1A2 bevorzugt hemmen (Chang et al., 2006).

Trotzdem konnte an Menschen im Wesentlichen kein Nachweis von medikamentösen Interaktionen mit Ginkgo gefunden werden. Eine Studie an gesunden Menschen zeigte z.B. dass die gleichzeitige Verabreichung von standardisierten Ginkgoextrakten die Disposition von Arzneimitteln, die durch CYP3A4 oder CYP2D6 metabolisiert werden, nicht signifikant verändert (Markowitz et al., 2003).

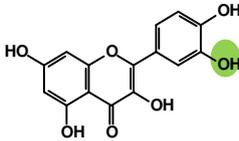
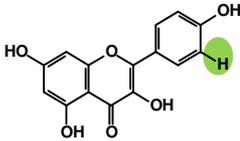
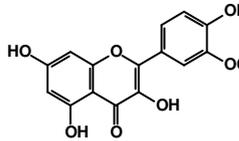
In Einzelfällen wurde bei älteren Epileptikern von Krämpfen berichtet. Diese Nebenwirkung war aber auf eine Einnahme von nicht standardisierten Ginkgoextrakten zurückzuführen (Granger, 2001; Haller et al., 2005).

## 2. BIOANALYTIK VON EGb 761 FLAVONOIDEN

### 2.1. Experimenteller Teil

Die Analytik der Flavonoide von EGb 761 *in vivo* bestand im Wesentlichen aus zwei Schritten. Zuerst wurden die eigentlichen Analyten Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin/Tamarixetin zugänglich gemacht und anschließend erfolgte die Quantifizierung dieser Analyten mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC). Hierzu wurden zunächst im Rahmen der Probenaufarbeitung die durch diverse Metabolisierungsschritte angehängten Reste mittels saurer Hydrolyse von den jeweiligen Flavonoidmetaboliten entfernt, damit Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin (s. Tabelle 3) als eigentliche Analyten erhalten werden konnten. Gleichzeitig wurden diese Analyten in demselben Arbeitsschritt aus der Hirnmatrix bzw. dem Plasma herausgelöst. Im nächsten Schritt wurden Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin mittels geeigneter RP-HPLC-Trennung quantifiziert.

Tabelle 3. Strukturen der wichtigsten Ginkgoflavonoidaglyka.

	Quercetin	Kämpferol	Isorhamnetin/ Tamarixetin
Molekülstruktur			
Molekulargewicht	302,24 g/mol	286,24 g/mol	316,27
Molekularformel	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>

#### 2.1.1. Probenaufarbeitung

Während Flavonoide von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin im Ginkgoextrakt EGb 761 zumeist als Flavonolglykoside oder Flavonolacylglykoside vorkommen, finden sich die freien Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin dort hingegen nur in sehr geringeren Konzentrationen (s. Abschnitt 1.2. Standardisierte Extrakte). *In vivo* werden die betrachteten Flavonolglykoside jedoch durch verschiedene Stoffwechselwege metabolisiert, wodurch als Ergebnis ein komplexes Gemisch von glukuronidierten, sulfatierten und methylierten Derivaten aus Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin erzeugt wird (s. Absatz 1.4.2. Pharmakokinetik der Flavonoide). Zur besseren analyti-

schen Erfassung dieses komplexen Gemisches wurden die reproduzierbaren, abtrennbaren Reste der Glukuronsäure und des Sulfates von den Metaboliten entfernt.

### *Hydrolyse*

Der erste Schritt der Methode bestand in der Vereinfachung der komplexen Mischung von Metaboliten zur Erleichterung der Analytik. Zu diesem Zweck wurde eine Hydrolyse durchgeführt, in der die Metaboliten der untersuchten Proben zu den entsprechenden Aglyka umgeformt werden konnten.

In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten der Hydrolyse beschrieben. Im Wesentlichen existieren zwei Ansätze: die saure Hydrolyse (Harborne, 1965; Hollman et al., 1996a) und die enzymatische Hydrolyse (Suzuki, 1962; Manach et al., 1996; Morrice et al., 2000; Morand et al., 2001). Von diesen beiden Möglichkeiten wurde die saure Hydrolyse gewählt. Einerseits findet hier die Zuckerabspaltung unabhängig von der Position des Zuckerrestes statt, wodurch auch eine Abspaltung der Glucuronsäure und des Sulphates von den entsprechenden Metaboliten erfolgt. Andererseits ist diese Art der Hydrolyse gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse wesentlich preiswerter.

Eine reproduzierbare Abtrennung der durch Metabolismus eingeführten Methylgruppen war hingegen nicht möglich, d.h. das Tamarixetin musste als zusätzlicher Analyt noch mitberücksichtigt werden. Isorhamnetin und Tamarixetin, folglich als Isorhamnetin/Tamarixetin bezeichnet, bei denen es sich um Isomere handelt, wurden in den Proben zusammen bestimmt, da sie koeluierten und unter den unten beschriebenen chromatografischen Bedingungen nicht getrennt wurden.

Folglich war es möglich, statt der gesamten komplexen Mischung der Flavonoidmetaboliten, nur deren entsprechende Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin zu bestimmen.

Zur Gewährleistung der Methodenentwicklung wurden zunächst Standardlösungen der entsprechenden Aglyka verwendet.

### *Stabilität*

Bei den meisten sauren Hydrolysen von Flavonoidglykosiden wird die Stabilität der Aglyka während der Aufarbeitung dadurch gewährleistet, dass die Hydrolyse zwei

Stunden lang mit Salzsäure in einem methanolisch-wasserhaltigen Milieu und unter Verwendung von unterschiedlichen Antioxidantien durchgeführt wurde. Sowohl das saure Milieu, das für die Hydrolyse sorgt, als auch die Verwendung von Methanol dienen für die Extraktion der Aglyka sowie für die Entfernung und den Ausfall von enthaltenen Proteinen während der Probenaufarbeitung.

Zur Gewährleistung der Stabilität der Analyten während der Probenaufarbeitung und Vermessung wurden zwei von den gängigsten Antioxidantien untersucht, d.h. tert-Butylhydrochinon (TBHQ) und Ascorbinsäure. Die entsprechenden Versuche wurden 120 min lang sowohl bei Raumtemperatur als auch bei der eigentlichen Hydrolysetemperatur von 90°C durchgeführt.

Bei der Untersuchung der methanolischen Standardlösung der Analyten Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin (12, 2 bzw. 2,5 ng/mL), die über einen Zeitraum von 120 min erfolgte, wurde festgestellt, dass bei Raumtemperatur beide Antioxidantien die Analyten vor Degradation schützen (s. Abbildung 16). Wie in Tabelle 4 gezeigt wird, lagen alle Werte in der Nähe von 100%, d.h. entsprachen der Nominalkonzentration.

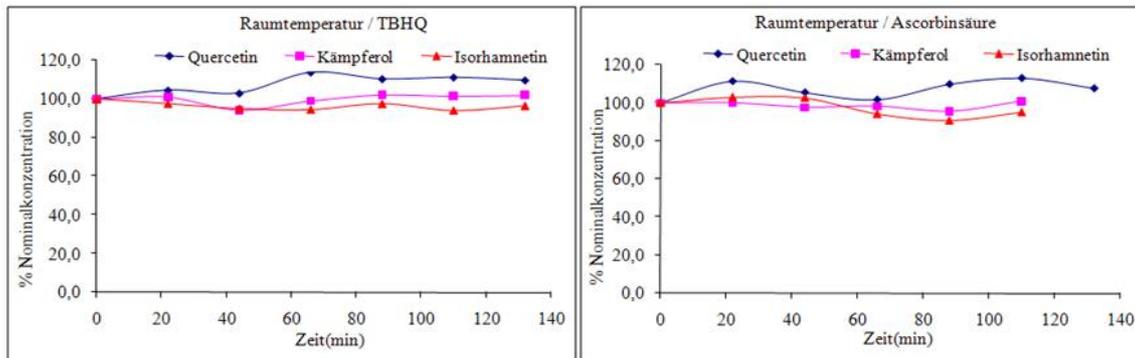


Abbildung 16. Stabilität von Aglyka bei Raumtemperatur in saurem Hydrolyse-Milieu (2M HCl 60% Methanol). Standardkonzentration: 12, 2 bzw. 2,5 ng/mL für Quercetin, Kämpferol bzw. Isorhamnetin.

Tabelle 4. Stabilität der Aglyka bei Raumtemperatur in saurem Hydrolyse-Milieu.

	TBHQ	Ascorbinsäure
Quercetin	107,6 (4,7%)	106,9 (4,5%)
Kämpferol	100,0 (2,8%)	98,8 (2,0%)
Isorhamnetin	96,6 (2,1%)	97,6 (5,1%)

\*Die Werte in Klammern entsprechen der relativen Standardabweichung ( R.S.D.) von n=6

Die Stabilität der Analyten bei 90°C in der sauren Hydrolyse ist in Abbildung 17 und Tabelle 5 dargestellt.

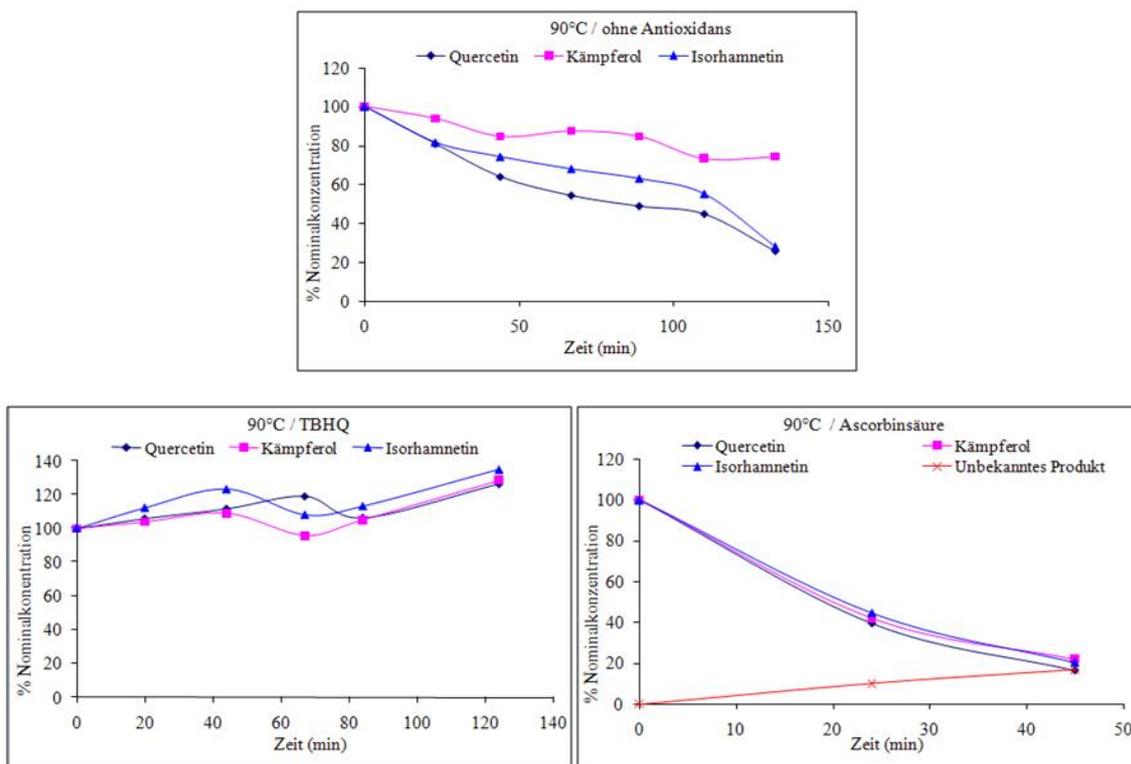


Abbildung 17. Stabilität bei 90°C in saurem Hydrolyse-Milieu (2M HCl, 60% Methanol). Standardkonzentration: 12, 2 bzw. 2,5 ng/mL für Quercetin, Kämpferol bzw. Isorhamnetin.

Tabelle 5. Stabilität bei 90°C in saurem Hydrolyse-Milieu.

	Ohne Antioxidans	TBHQ	Ascorbinsäure
Quercetin	66,6% (36,9)	111,5% (8,7)	23,0% (181,3)
Kämpferol	59,7% (16,2)	107,1% (10,8)	40,8% (95,2)
Isorhamnetin	85,55 (26,3)	115,3% (10,6)	44,5% (87,4)

\*Die Werte in Klammern entsprechen der R.S.D. von n=6

Für den Fall, bei dem keine Antioxidantien hinzugegeben wurden, sank die Konzentration der Analyten innerhalb von 40 min auf 60-80% (90°C, ohne Antioxidans). Diese Zeit war nicht ausreichend für die Hydrolyse. Bei der Verwendung von Ascorbinsäure sank die Konzentration der Analyten Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin innerhalb von 40 Minuten auf ca. 20% und es gab eine Reaktion, bei der eine unbekannte Substanz produziert wurde (90°C/Ascorbinsäure).

Nur bei der Verwendung von TBHQ wurde ein ausreichender Schutz während der Aufarbeitungszeit erreicht (90°C/TBHQ). Aus diesem Grund wurde TBHQ als Antioxidans gewählt

#### **2.1.1.1. Bedingungen für die anschließende Probenaufarbeitung von Plasma und Hirn**

Die Probenaufarbeitung vom Plasma und den Gehirnhomogenaten gestaltete sich ähnlich. Zuerst wurden Proben von Plasma (30 µL) bzw. Gehirnhomogenat (600 µL) mit 400 µL methanolischer TBHQ 5 mg/mL (Endkonzentration 1 mg/mL) in spitzkonischen Zentrifugenröhrchen gemischt. Anschließend wurde 800 µL Salzsäure (Endkonzentration 2 M HCl) in Wasser und 770 bzw. 200 µL Methanol hinzugefügt, um die endgültigen Konzentrationen von 60% Methanol für die Plasmaproben bzw. 30% Methanol für die Gehirnproben in einem abschließenden Volumen von 2 mL zu erreichen. Die Mischung wurde gevortext und 120 min bei 90°C in einem vorgewärmten Aluminiumblock (Liebisch, Bielefeld) hydrolysiert und extrahiert. Nach der Hydrolyse/Extraktion wurden die abgekühlten Proben 10 Minuten lang bei 3774× g zentrifugiert. Durch dieses Verfahren wurde eine Mischung der Ginkgoaglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin erzeugt. Zum Schluss wurde der Überstand in HPLC-Vials gefüllt und mittels HPLC-FD analysiert. 200 µL vom Überstand wurden in das HPLC-System eingespritzt. Alle Standards, Kontrollen und Blanks wurden ähnlich verarbeitet.

#### **2.1.2. HPLC-Methodenentwicklung**

##### **2.1.2.1. Detektion der Analyten**

Nach der Probenaufarbeitung war eine Detektion und Trennung der Analyten von den entsprechenden Matrixsubstanzen erforderlich, die in den biologischen Proben (Plasma und Gehirn) vorlagen. Zunächst wurden Standardlösungen der Aglyka verwendet, um die Entwicklung der Methode zu gewährleisten. In der Literatur werden verschiedene Methoden zum Nachweis von Flavonoiden beschrieben. Die meisten dieser Methoden basieren auf einer chromatographischen Trennung mit verschiedenen Detektoren. Zum Einsatz kommen hierbei folgende vier Detektionsverfahren:

- ▲ *Elektrochemische Detektion (Erlund et al., 2000; Bolarinwa and Linseisen, 2005).*

Quercetin: 1,77 ng/mL, Standardlösung; 0,5 ng/mL, Plasma

Kämpferol: 0,48 ng/mL, Standardlösung

Isorhamnetin: 0,5 ng/mL, Standardlösung

- ▲ *Fluoreszenzdetektion (Hollman et al., 1996b; Hollman, 2001).*

Quercetin: 0,15 ng/mL, Standardlösung; 2 ng/mL, Plasma; 3 ng/mL, Urin

Kämpferol: 0,05 ng/mL, Standardlösung

Isorhamnetin: 0,05 ng/mL, Standardlösung

- ▲ *Massenspektrometrische Detektion (Watson and Pitt, 1998; Watson and Oliveira, 1999; Wang and Morris, 2005).*

Quercetin: 0,1 ng/mL, Plasma; 0,5 ng/mL, Urin; 10 pg on column, Urine;  
20 pg on column, Tabletten

- ▲ *UV-Detektion (Nielsen and Dragsted, 1998; Ishii et al., 2003; Wang and Morris, 2005).*

Quercetin: 1,0 ng/mL, Standardlösung; 0,35 ng/mL, Plasma; 5 ng/mL, Urin;

Kämpferol: 1,1 ng/mL, Standardlösung

Alle o.g. Verfahren sind prinzipiell geeignet zur Quantifizierung sehr niedriger Konzentrationen von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin. Der Fluoreszenzdetektor weist jedoch gegenüber den anderen Detektoren hinsichtlich Empfindlichkeit und Robustheit deutliche Vorteile auf.

Die Erfassung der Flavonoide durch den Fluoreszenzdetektor basiert auf ihrer Eigenschaft, mit Metallionen, wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Al}^{3+}$ , Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie zu bilden (Hollman et al., 1996b; Cornard and Merlin, 2002; de Souza and De Giovanni, 2005). Die entstehenden Komplexe zeigen eine sehr hohe Molekularfluoreszenz, die u.a. zur Bestimmung von Metallspuren herangezogen wird (Lian et al., 2003). Die Fluoreszenz-Detektion durch Ausbildung von Aluminiumkomplexen wurde für die hier durchgeführte Studie gewählt, weil sie einen guten Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und kostengünstiger Zugänglichkeit darstellte. Darüber hinaus hat der Aluminiumkomplex gute Ergebnisse bei der Quantifizierung von Quercetin und

Isorhamnetin/Tamarixetin im Gehirn im Rahmen der Johanniskrautanalytik hervorgebracht (Paulke et al., 2006).

Zur Erzeugung der fluoreszierenden Aglyka-Komplexe wurde eine Online-Nachsäulen-Derivatisierung durchgeführt, bei der sich Aglykon-Aluminium-Komplexe bildeten. Hierzu wurden mit Hilfe einer zusätzlichen Pumpe (Knauer, Modell 64) 1,5 M Aluminiumnitrat in mit 7,5% Eisessig angesäuertem Methanol unter einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 mL/min in den Eluentenfluss gebracht. Die eigentliche Komplexbildung fand im Anschluss hieran online in einem Nachsäulenkapillarreaktor mit  $5\text{m} \times 0,5\text{mm}$  statt. Die erzeugten Fluoreszenzkomplexe wurden bei 485 nm Emissionswellenlänge unter Verwendung eines Varian Prostar-Fluoreszenzdetektors ermittelt, bei dem die Anregungswellenlänge auf 422 nm eingestellt wurde.

Die Stöchiometrie der erzeugten Komplexe wird im Wesentlichen noch untersucht (Cornard and Merlin, 2002). Mit Quercetin können z. B. die in Abbildung 18 dargestellten Reaktionen stattfinden.

Demnach ist nur Komplex I in saurem Milieu stabil. Bei sehr hohen Konzentrationen von  $\text{Al}^{\text{III}}$ , kann der Komplex II (2:1) entstehen. Unter denen in der entwickelten Methode beschriebenen Bedingungen, d.h. methanolischen/wasserhaltigen Lösungsmittel unter sauren Bedingungen, ist ein  $\text{Al}^{\text{III}}$ :Quercetin-Komplex im Verhältnis 2:1, zu erwarten (Cornard and Merlin, 2002).

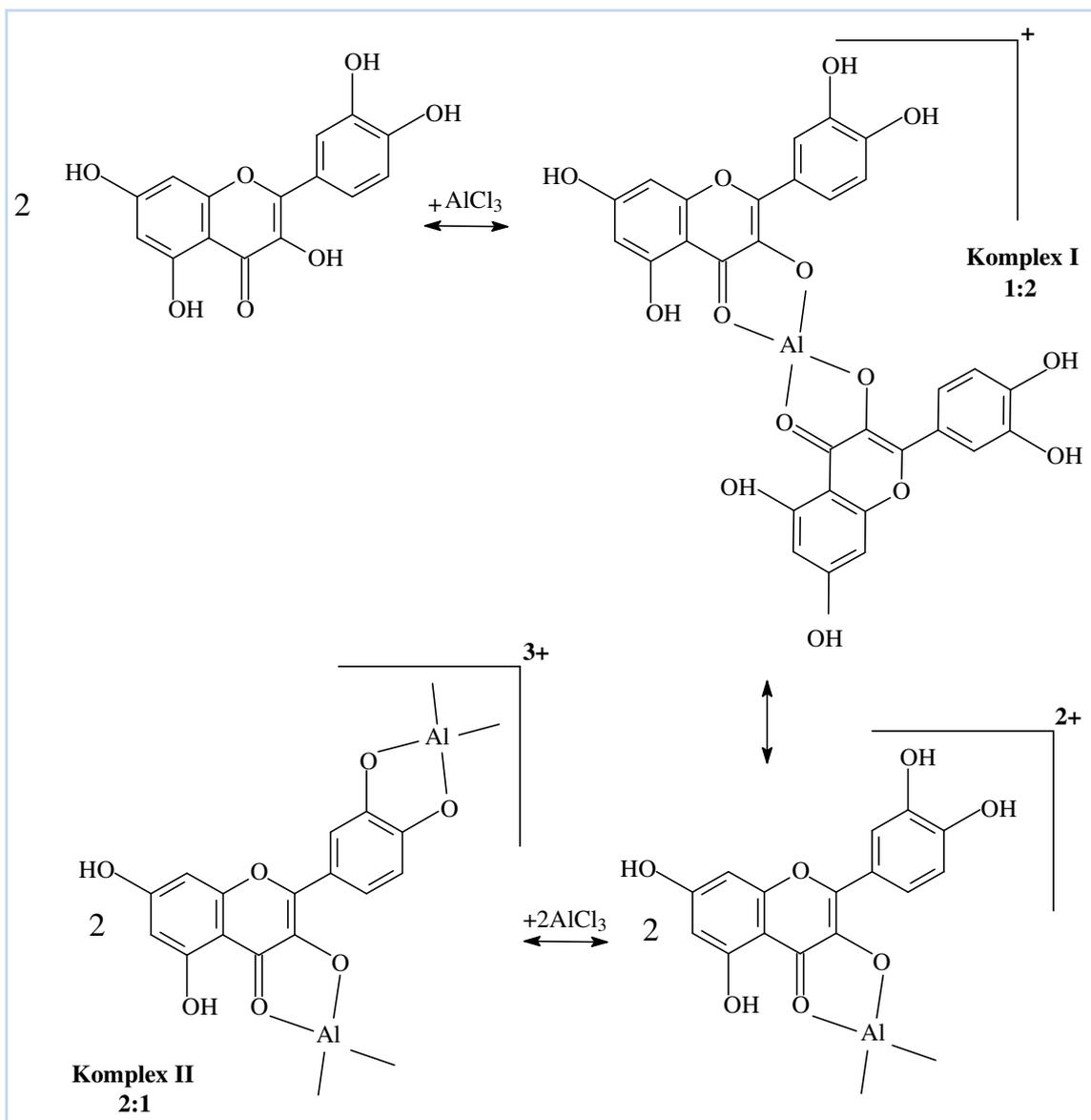


Abbildung 18. Vorgeschlagene Mechanismen für die Komplexierung von Quercetin mit Al<sup>(III)</sup>.

### 2.1.2.2. Trennung der Analyten

Zur Bestimmung der besten Trennmethode wurden die Standardlösungen der jeweiligen Analyten verwendet. Dabei wurden die optimalen Bedingungen für die stationäre und mobile Phase (Säule, Lösungsmittel, pH-Wert und Ionenstärke) sowie für den Elutionsmodus untersucht.

Die chromatische Trennung wurde letztendlich auf einem Varian Prostar Gerät mittels einer C18-Umkehrphasensäule (RP, Multisphere 120, 125 x 4 mm I.D., Partikeldurchmesser 5 µm) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min isokratisch durchgeführt.

Als mobile Phase wurde eine Mischung von 28% Acetonitril und 72% wässrigem Puffer (pH 2,5 Chloressigsäure:/Natriumchloracetate, 0,025 M) verwendet. Die organischen und wasserhaltigen Phasen wurden durch einen Online-Degaser (Degasys DG-1210) entgast.

Die Bedingungen der finalen Methode sind in Abbildung 19 dargestellt.

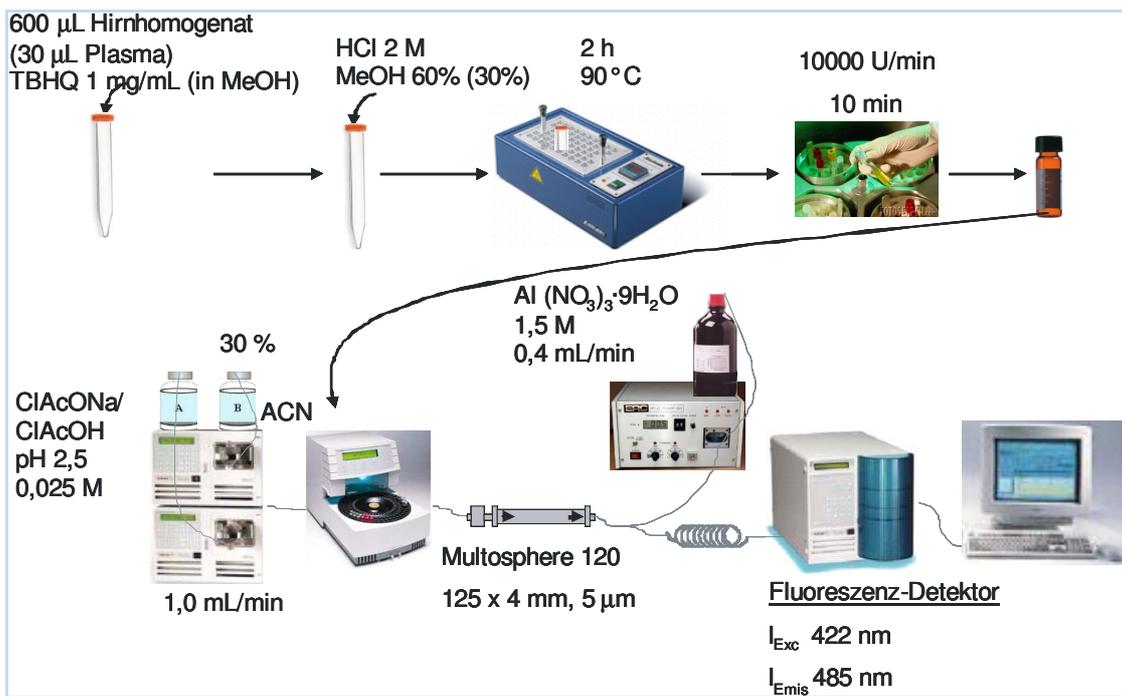


Abbildung 19. Darstellung der entwickelten Methode zur Untersuchung der Plasma- und ZNS-Bioverfügbarkeit von Ginkgo flavonoiden an Ratten.

Abbildung 20 zeigt ein Beispiel für ein typisches Chromatogramm, welches mit der entwickelten HPLC-FD Methode erhalten wurde.

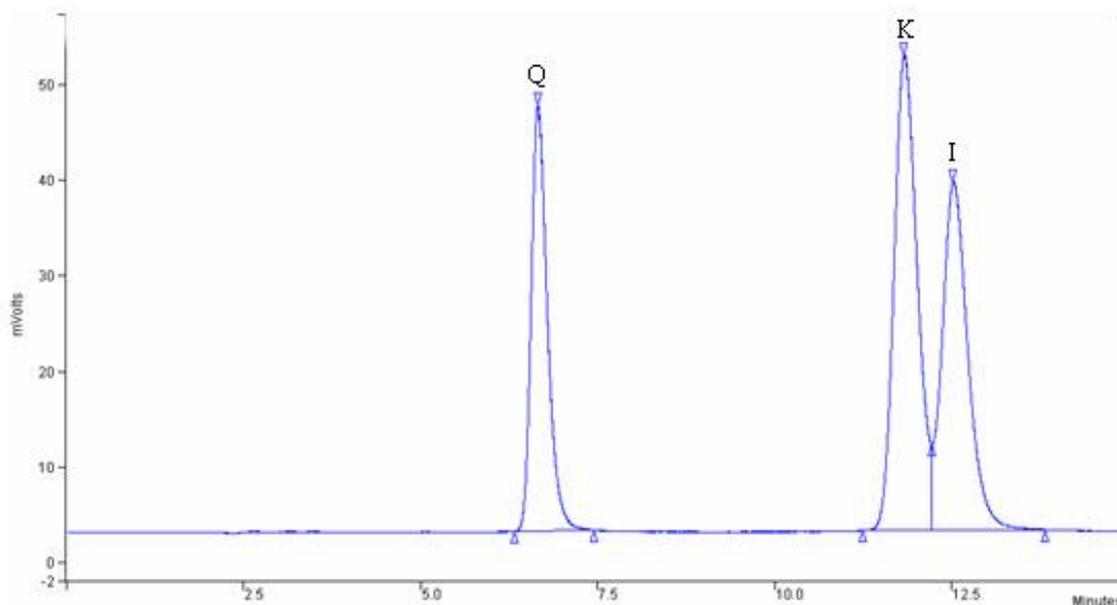


Abbildung 20. Typisches Chromatogramm, das mit der für HPLC-FD entwickelten Methode erhalten wurde. Isokratische Trennung, Säule: RP-C18, mobile Phase: 28% ACN. Standard von Quercetin (12 ng/mL), Kämpferol (2 ng/mL) und Isorhamnetin (2,5 ng/mL).

Wie in der Abbildung zu sehen ist, lassen sich mit Hilfe der entwickelten Trennmethode die Analyten Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin zufriedenstellend quantifizieren. Durch den moderaten Gehalt an organischem Lösungsmittel in der mobilen Phase (28% ACN), werden innerhalb der ersten Minuten des chromatographischen Verlaufs mögliche interferierende Komponenten von Plasma- und Gehirnproben und erst danach die untersuchten Analyten eluiert. Dieser Ansatz bietet einen guten Kompromiss zwischen der Erhaltung von gut definierten Peaks und einer möglichst kurzen Analysezeit.

Nach der Entwicklung und vor der Validierung der Methode in den Hirn- und Plasmaproben wurden die Injektionsreproduzierbarkeit und die Linearität des Detektors bei steigenden Konzentrationen von Standardlösungen geprüft, um den guten Betrieb der Anlage zu garantieren.

#### *Injektionsreproduzierbarkeit*

Die Injektionsreproduzierbarkeit der Analyten wurde durch dreimaliges Injizieren einer Standardlösung von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin bei einer jeweiligen Konzentration von 0,25 ng/mL ermittelt. Die R.S.D. betragen hierbei 9, 4,1 und 3,5 für Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin.

### Linearität des Detektors

Zur Ermittlung der Linearität des Detektors wurden Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationen der drei Aglyka in der anschließenden Probenaufarbeitungslösung vorbereitet und analysiert. Hierzu wurden drei Kurven an drei verschiedenen Tagen vorbereitet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Signalstärke des Detektors mit einer linearen Gleichung repräsentiert werden kann. Das lineare Modell ist daher für die Ermittlung des Detektorsignals geeignet. Die Eichgeraden in Abbildung 21 zeigen die Mittelwerte der drei Tage. Die Y-Fehlerindikatoren repräsentieren dabei die Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M) von n=3.

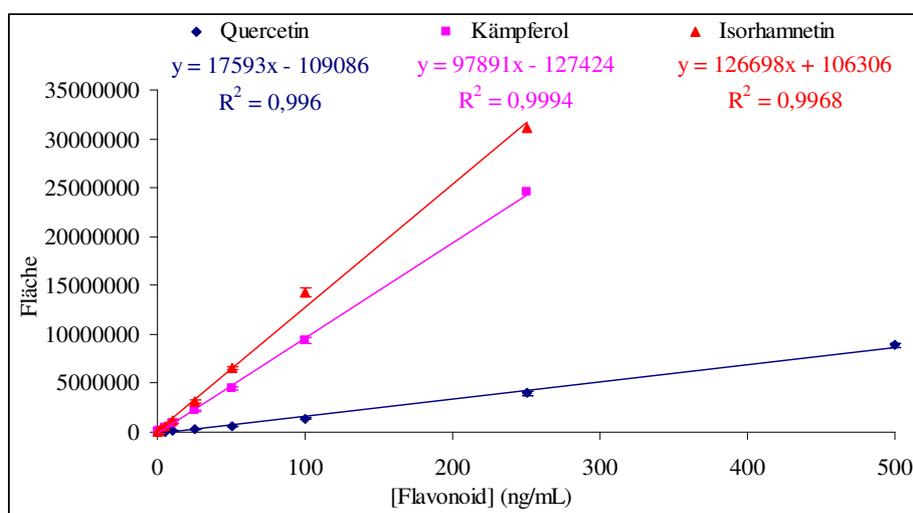


Abbildung 21. Ermittlung der Linearität des Detektors (n=4).

### 2.1.3. Validierung der Methode

Die entwickelte Methode wurde nach den gängigen Richtlinien für Analyseverfahren für Plasma- und Gehirnproben validiert (Karnes et al., 1991; Shah et al., 2000). Ermittelt wurden Spezifität, Linearität, Bestimmungsgrenze, Bestimmungsbereich, Wiederfindung, Richtigkeit, Präzision und Stabilität.

#### 2.1.3.1. Spezifität

Unter Spezifität einer analytischen Methode versteht man die Fähigkeit zur zweifelsfreien Bestimmung eines Analyten in Gegenwart von anderen zu erwartenden Komponenten (u.a. chemisch ähnliche Substanzen, Matrixbestandteile, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Hilfsstoffe und weitere Inhaltsstoffe). Die Spezifität kann anhand einer

selektiven Trennung (hier Chromatographie) und einer strukturspezifischen Detektionsmethode (hier Fluoreszenzdetektion durch Nachsäulenkomplexierung) erzielt werden.

Die Spezifität wurde durch den Vergleich von sechs Hirn- und Plasmablindproben ( $n = 6$ ) mit jeweils sechs durch Quercetin-, Kämpferol- und Isorhamnetin gespikten Hirn- und Plasmaproben überprüft. Die Analytenkonzentration der gespikten Hirn- und Plasmaproben betrug hierbei 10 ng/mL für Quercetin und 2 ng/mL für Kämpferol und Isorhamnetin. Die Abwesenheit von Matrixsignalen bei den entsprechenden Retentionszeiten (Quercetin 7,8 min, Kämpferol 14,6 min, Isorhamnetin/Tamarixetin 15,7 min) ist in den jeweiligen HPLC-Chromatogrammen (s. Abbildung 22) zu erkennen. Damit ist die Spezifität der entwickelten Methode für beide Matrizen bewiesen.

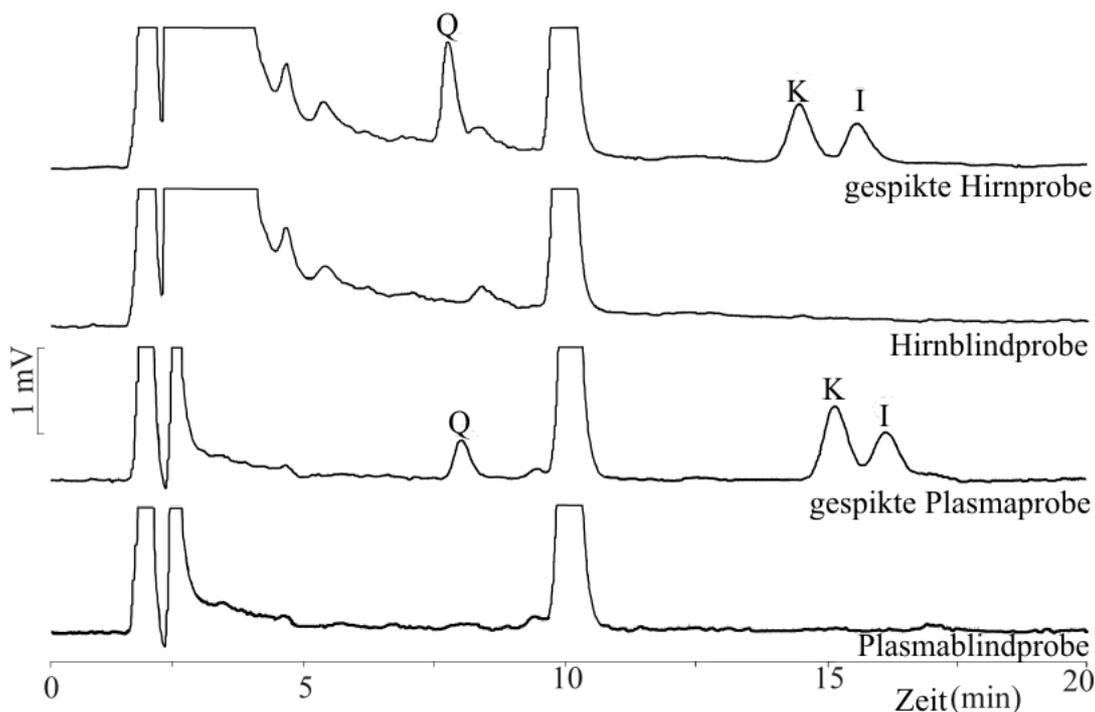


Abbildung 22. Typische HPLC-Chromatogramme aus der Analyse von Hirn- und Plasmaproben. Jeweils 10 ng/mL gespikte Konzentration von Quercetin (Q) bzw. 10 ng/mL von Kämpferol (K) und Isorhamnetin (I).

### 2.1.3.2. Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit, innerhalb definierter Grenzen Resultate zu erzielen, die zur Konzentration von Analyten in einer Probe direkt proportional sind. In bestimmten Fällen kann diese Proportionalität durch mathematische Umwandlungen der Testergebnisse hergestellt werden. Für die Erstellung einer Regressionsgeraden wird ein Minimum von 5 Konzentrationen benötigt. Die gemessenen Peakflächen der Standardproben werden dabei graphisch gegen den Gehalt der Proben aufgetragen. Zur Beurteilung der Linearität eines analytischen Verfahrens dienen der Determinationskoeffizient ( $R^2 > 0,98$ ), der Y-Achsenabschnitt und die Steigung der Regressionsgerade. Sowohl die Präzision als auch die Richtigkeit der ermittelten Werte sollten in den jeweils vorgegebenen Grenzen liegen. Der Determinationskoeffizient  $R^2$  ist eine Indexzahl, die angibt, ob und wie ein bestimmtes Variablenpaar x und y miteinander linear korreliert ist. Seine Werte liegen zwischen 0 und 1, wobei eine Nähe zu Null einen funktionellen Zusammenhang zwischen x und y ausschließt.

Durch mehrfache Wiederholung der gesamten Messreihe wurde die Linearität der entwickelten Methode untersucht und anhand dieser die Präzision und Richtigkeit überprüft. Zur Überprüfung der Linearität wurden Regressionsgeraden in Plasma und Hirn erstellt. Dafür wurden Plasma- und Hirnblindproben mit Quercetin (0 bis 500 ng/mL) sowie Kämpferol und Isorhamnetin (0 bis 250 ng/ mL) mit unterschiedlichen Konzentrationen ( $n \geq 9$ ) gespikt und mit Hilfe der entwickelten Methode analysiert. Anschließend wurden die erhaltenen Peakflächen der gespikten Standardproben graphisch gegen den Gehalt der Probe dargestellt. Zur Beurteilung der Linearität wurden die Determinationskoeffizienten ( $R^2$ ) der entsprechenden Kurven, die Y-Achsenabschnitte und die Steigungen der Regressionsgeraden statistisch analysiert. Die Messreihen wurden an 3 verschiedenen Tagen wiederholt. Die erhaltenen Kurven in Plasma und Hirn sind in Abbildungen 23 und 24 wiedergegeben. Die Intervalle für jeden Messpunkt entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) von  $n=3$ .

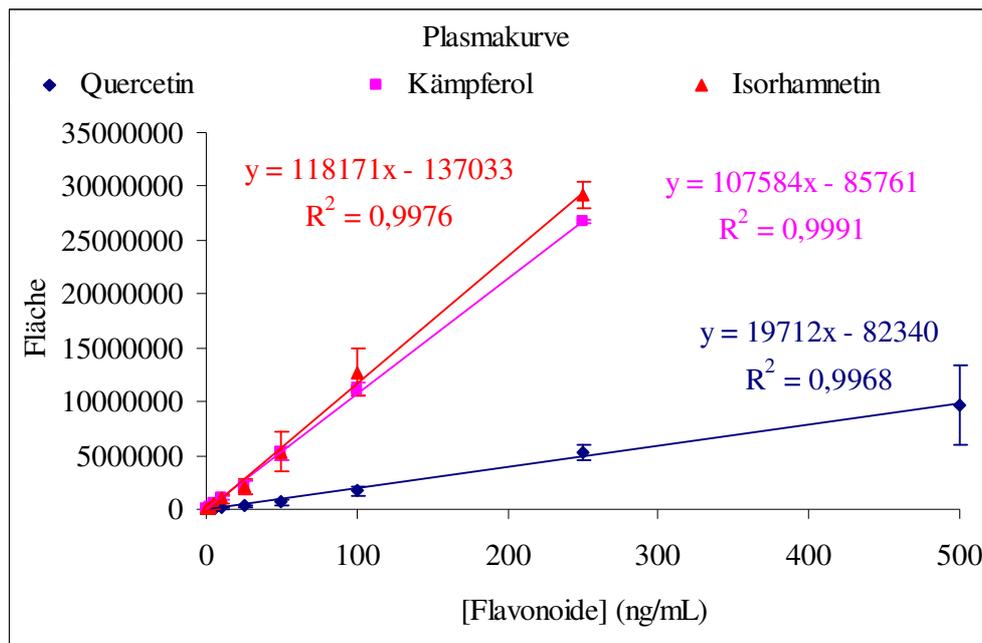


Abbildung 23. Ermittlung der Linearität der Methode im Plasma (n=3).

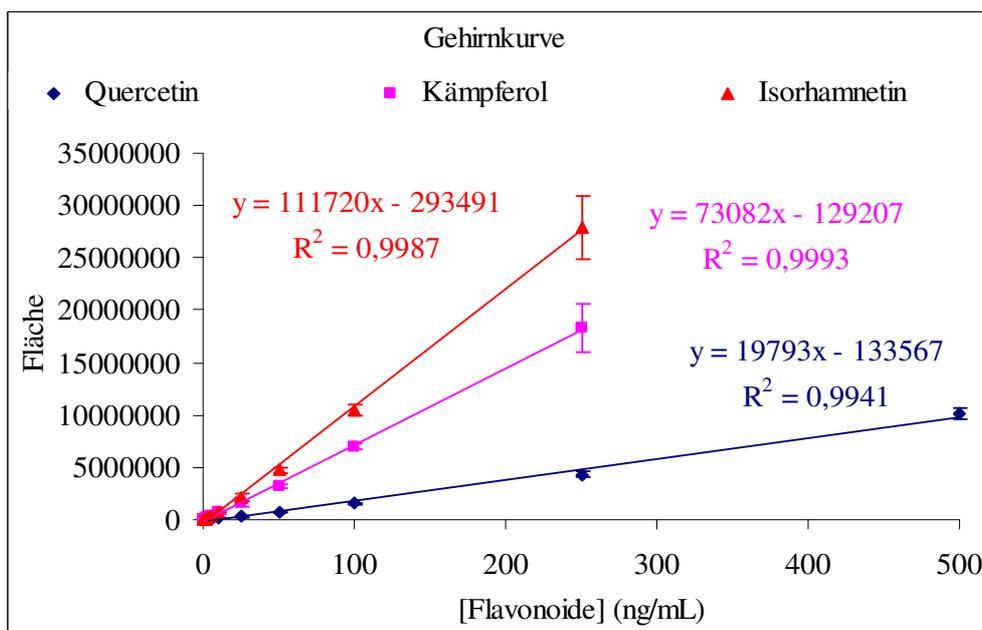


Abbildung 24. Ermittlung der Linearität der Methode im Gehirn (n=3).

Bei allen drei Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin war der Determinationskoeffizient  $R^2 > 0,99$  und der Unterschied zwischen dem Y-Abschnitt und Null statistisch nicht signifikant. Hierdurch wurde festgestellt, dass das lineare Modell zur Darstellung der Daten geeignet ist.

### 2.1.3.3. Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Unter der Nachweisgrenze (LOD) einer analytischen Methode wird die geringste Analytenmenge in einer Probe verstanden, die zwar festgestellt, aber nicht als quantitativer Wert bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze kann nach mehreren Möglichkeiten bestimmt werden:

- (a) *Basierend auf visueller Auswertung.* Diese Methode wird hauptsächlich für nicht-instrumentelle Analysen verwendet, wobei anhand einer Verdünnungsreihe das verlässlich bestimmbare Minimum ermittelt wird.
- (b) *Basierend auf dem Signal/Rausch-Verhältnis.* Dieser Ansatz ist nur geeignet für Methoden, die ein Grundrauschen verursachen und gilt vor allem bei chromatographischen Verfahren als Methode erster Wahl. Das Signal/Rausch-Verhältnis wird bestimmt, indem die Signale von Proben geringer Konzentration mit denen von Blindwerten verglichen werden. Für die HPLC bedeutet dies, dass die jeweiligen Signale des Analyten an der bestimmten Retentionszeit dreifach stärker sein müssen als mögliche Interferenzen in den Blindproben.
- (c) *Basierend auf der Standardabweichung der Signale und der Steigung der Regressionsgeraden.* Diesem Ansatz liegt folgende Formel zu Grunde:

$$\text{LOD} = \frac{3,3s}{a}$$

Die Steigung  $a$  ergibt sich aus der Regressionsgeraden, während die Standardabweichung  $s$  sich aus dem Vergleich mehrerer Blindproben oder alternativ mehrerer Kalibriergeraden (Vergleich von Regressionsgeraden oder Y-Achsenabschnitte) zusammenfügt.

Für die Quantifizierung eignet sich die Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ). Darunter wird die Analytenmenge einer Probe verstanden, die mit der notwendigen Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Entsprechend der Nachweisgrenze gibt es analog für die Bestimmungsgrenze die gleichen Ansätze. Bei der visuellen Auswertung bedarf es einer Quantifizierung der niedrigsten Konzentration mit akzeptabler Präzision und Richtigkeit. Das Signal/Rausch-Verhältnis beträgt hier typischerweise 10:1. In der Formel zur Berechnung der Bestimmungsgrenze, die auf der Standardabwei-

chung basiert, erhöht sich bei gleicher Ermittlung der einzelnen Parameter nur der Faktor von 3,3 auf 10.

Während der Validierung der hier dargestellten Methoden wurde die unterste Bestimmungsgrenze (LLOQ) als die niedrigste Konzentration in der Probe definiert, die mit der notwendigen Präzision und Richtigkeit gemessen werden kann ( $R.S.D \leq 20\%$ ). In dieser Methode wurde die LLOQ ermittelt. Die im Experiment durch Spiken von Hirn- und Plasmaproben (jeweils  $n=6$ ) ermittelten LLOQ sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6. Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)–Werte.

	Plasma		Hirn	
	LLOQ (ng/mL)	R.S.D.	LLOQ (ng/mL)	R.S.D.
Quercetin	0,125	1,4%	2,500	4,0%
Kämpferol	0,125	10,3%	0,125	9,4%
Isorhamnetin	0,125	12,7%	0,125	7,3%

Für Plasma betrug die LLOQ der drei Flavonoide Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin demnach jeweils 0,125 ng/mL. Beim Hirn betragen die Werte 2,5 ng/mL für Quercetin und 0,125 ng/mL für Kämpferol und Isorhamnetin. Bei Konzentrationen niedriger als die LLOQ waren entweder keine Signal zu sehen oder die relative Standardabweichung betrug mehr als 20%.

#### 2.1.3.4. Bestimmungsbereich

Der Bestimmungsbereich ist das Konzentrationsintervall, in welchem der zu bestimmende Stoff präzise und richtig bestimmt werden kann. Er ergibt sich aus der unteren und oberen Bestimmungsgrenze bzw. dem Bereich, für den die Linearität bewiesen wurde. Für Kämpferol und Isorhamnetin war der Bestimmungsbereich 0,125–250 ng/mL für beide Matrizen (Plasma und Gehirn). Für Quercetin betrug der Wert im Plasma 0,125-250 ng/mL und 2,5-500 ng/mL im Gehirn.

Analytenkonzentrationen unterhalb des o.g. Bestimmungsbereiches erfüllten nicht mehr die Kriterien für Präzision und Richtigkeit. Analytenkonzentrationen oberhalb des o.g. Bestimmungsbereiches führten zu einer Sättigung des Fluoreszenzdetektors und folglich zu einer Abweichung der Linearität.

### 2.1.3.5. Wiederfindung

Die Wiederfindung stellt ein Maß für die Vollständigkeit der Extraktion von Analyten aus einer Probe dar. Es gibt zwei Arten zur Bestimmung der Wiederfindung, relative und absolute Wiederfindung, die auf folgende Weise berechnet werden:

- 1) *Bestimmung der absoluten Wiederfindung.* Diese erfolgt durch einen Vergleich der Signale der Analyten, die bei gespikten Proben nach der Extraktion aus der jeweiligen Matrix und Standardlösungen gleicher Konzentration in reinem Lösungsmittel erhalten werden.
- 2) *Bestimmung der relativen Wiederfindung.* Hierfür werden die Peakflächen der Proben, denen der Analyt vor der Extraktion zugegeben wurde, mit jenen verglichen, denen dieselbe Nominalkonzentration an Analyten nach der Extraktion zugespielt wurde. Das Verhältnis dieser beiden Werte wird, wie auch bei der absoluten Wiederfindung, in Prozent ausgedrückt.

In den erstellten Methoden wurde jeweils die absolute Wiederfindung ermittelt. Die Präzision, die zur Bewertung der Wiederfindung herangezogen wird, sollte hierbei  $\pm 15\%$  (am LLOQ  $\pm 20\%$ ) nicht überschreiten. Es wurde im besten Fall eine Wiederfindung von 100% angestrebt. Viel wichtiger war jedoch, dass die berechnete Wiederfindung über alle Konzentrationen konstant bei einem Wert lagen.

Die absolute Wiederfindung wurde im gesamten Bestimmungsbereich jeweils dreimal ( $n = 3$ ) bestimmt für alle Analyten (Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin) und die beiden Matrizen (Plasma und Hirn). Für jeden Analyt und jede Matrix wurden die Werte der Wiederfindung (extrahierte gespikte Proben) gegen die nominellen gespikten Konzentrationen (Standardlösung) in Abbildung 25 graphisch dargestellt.

Die Steigungen der Kurven repräsentieren dabei die Anteile der wiedergefundenen Substanzen (durchschnittliche Wiederfindung) im linearen Bestimmungsbereich. Demnach wäre bei einer Wiederfindung von 100% die Steigung  $m = 1$ . Die Ergebnisse der Wiederfindung für die drei Aglyka in der Plasma- und Hirnmatrix sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Da die Werte im gesamten Bestimmungsbereich für alle Analyten konstant waren und die Präzision und Richtigkeit unterhalb der Akzeptanzkriterien lagen, war es nicht erforderlich, die Probenaufarbeitungsmethode zu verbessern. Zudem erwies sich die Verwendung der Eichkurve zur Quantifizierung als zulässig.

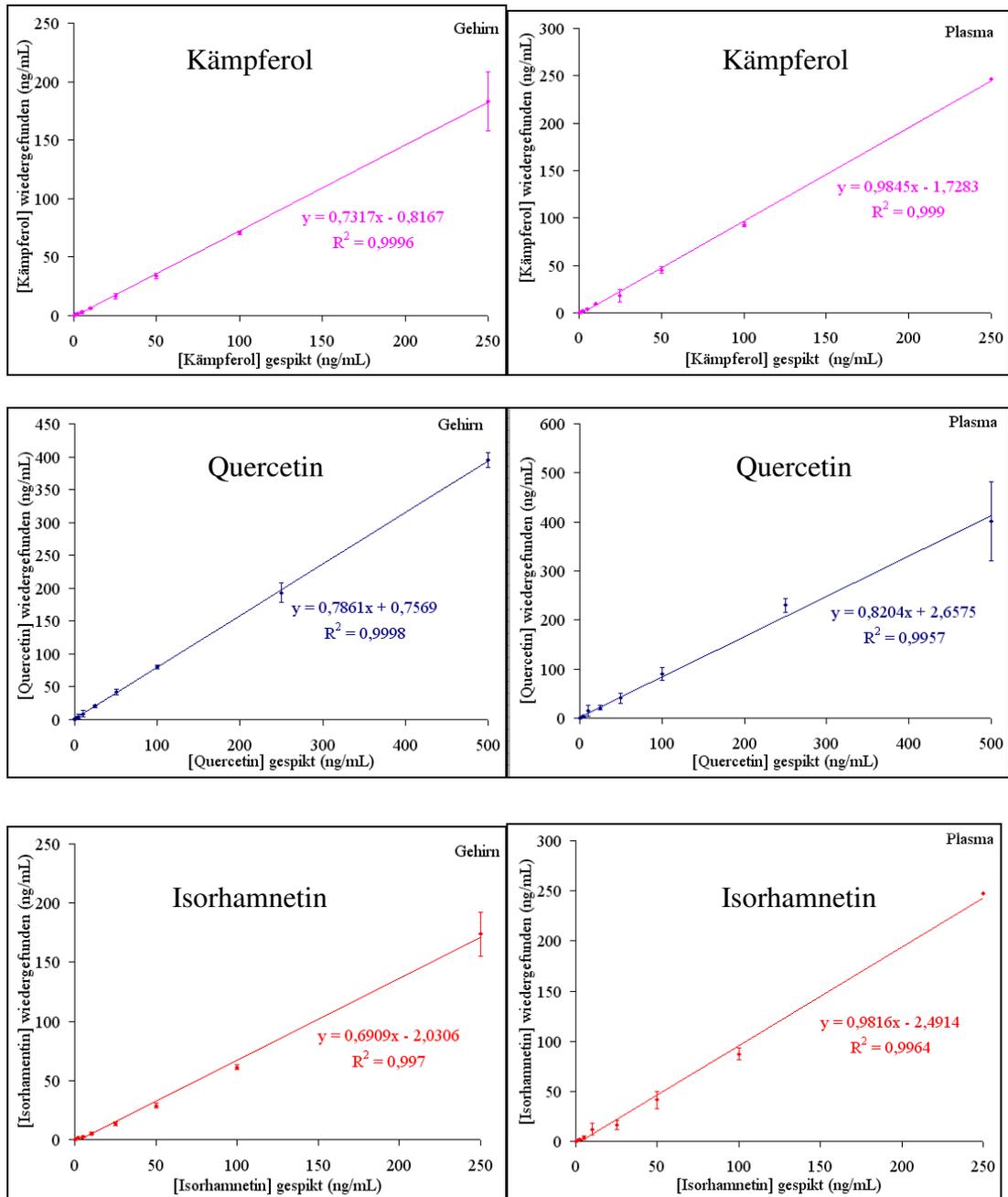


Abbildung 25. Ergebnisse der Ermittlung der Wiederfindung (n=3).

Tabelle 7. Ergebnisse der Werte für die Wiederfindung der Methode (n=3).

	Plasma	Hirn
Quercetin	73,2	98,5
Kämpferol	78,6	82,0
Isorhamnetin	69,1	98,2

### 2.1.3.6. Richtigkeit und Präzision

Die ermittelten Peakflächen stellen ein direktes Maß für die Kalkulation der Analytkonzentration in unbekanntem Proben dar. Somit kommt der Bestimmung ihrer Richtigkeit und Präzision innerhalb des Validierungsprozesses eine große Bedeutung zu. Die Richtigkeit einer analytischen Methode drückt die Übereinstimmung zwischen dem gefundenen bestimmten Wert und dem Nominalwert aus. Nach der Richtlinie ICH Q2A ist die Richtigkeit erfüllt, wenn die Präzision, Linearität und Spezifität bewiesen sind.

Die Richtigkeit ergibt sich durch die Differenz zwischen dem gemessenen Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und dem geltenden „richtigen Wert“, in diesem Fall die gespikete Nominalkonzentration ( $\mu$ ). Bei Überschreitung der o.g. Toleranzgrenzen (Abweichung von mehr als  $\pm 15\%$  im Allgemeinen bzw.  $\pm 20\%$  bei LLOQ) kann auf einen *systematischen Fehler* geschlossen werden.

Die Präzision einer analytischen Methode ist ein Maß für die Übereinstimmung (Streuung) der Messergebnisse bei wiederholter Durchführung eines Analyseverfahrens mit einer homogenen Probe. Sie erlaubt demnach eine Aussage über die Anfälligkeit gegenüber zufälligen Fehlern. Unterschieden werden drei Präzisionsarten:

- 1) *Wiederholungspräzision (repeatability)*. Sie basiert auf voneinander unabhängigen Ergebnissen einer Probe, die in kurzen Abständen unter identischen Bedingungen (gleiche Verfahren, Mitarbeiter, Geräteausrüstung und gleiches Labor) durchgeführt werden. In der HPLC beeinflussen diese Parameter vorrangig das Injektionssystem und die Flusskonstanz der Pumpe.
- 2) *Reproduzierbarkeit (reproducibility)*. Darunter wird eine Beurteilung der Analysergebnisse verstanden, die zwar mit identischem Verfahren und Material, aber in unterschiedlichen Laboren und durch unterschiedlichen Mitarbeiter und

Geräteausrüstungen ermittelt werden (z.B. Arzneibuch-Monographien). Die Reproduzierbarkeit ist die Nähe der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen, die mit der gleichen Methode unter unterschiedlichen Bedingungen ausgewertet werden. Hier im Experiment ergab sie sich aus der Standardabweichung von drei Eichkurven, die an unterschiedlichen Tagen gemessen wurden.

- 3) *Laborpräzision (intermediate precision)*. Hiervon wird gesprochen, wenn bewusste Änderungen eines Parameters (Tag, Bearbeiter, Gerät) bei der Untersuchung derselben Probe stattfinden.

Die Präzision kann durch die R.S.D. zahlenmäßig erfasst und als Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit berechnet werden. Die Präzision wird als relative Standardabweichung der Streuung der Einzelwerte um ein arithmetisches Mittel der gemessenen Werte ausgedrückt und nach folgenden Formeln berechnet:

Arithmetisches Mittel: 
$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Standardabweichung: 
$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Relative Standardabweichung: 
$$\text{R.S.D.} = V_k = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

Bei bioanalytischen Analysemethoden sollte die Präzision und die Richtigkeit bei mindestens drei Konzentrationen an einem einzelnen Tag (intra-day) sowie an unterschiedlichen Tagen (inter-day) nachgewiesen werden.

Zur Ermittlung der Richtigkeit wurden Blindproben mit den jeweiligen Analyten im gesamten Bestimmungsbereich gespikt, dann aufgearbeitet und mit der entwickelten Methode analysiert. Anschließend wurden die ermittelten Konzentrationen mit den Nominalwerten verglichen.

Die Richtigkeit und Präzision wurde im gesamten linearen Bestimmungsbereich geprüft. Die Durchschnittskonzentrationen der gefundenen Werte ( $\bar{x}$ ) von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin wurden hierfür mit den Nominalkonzentrationen ( $\mu$ ) verglichen. Zur

Auswertung wurden die gefundenen Werte gegen die gespikten nominellen Konzentrationen für jeden Analyt in grafischen Kurven veranschaulicht (s. Abbildung 26).

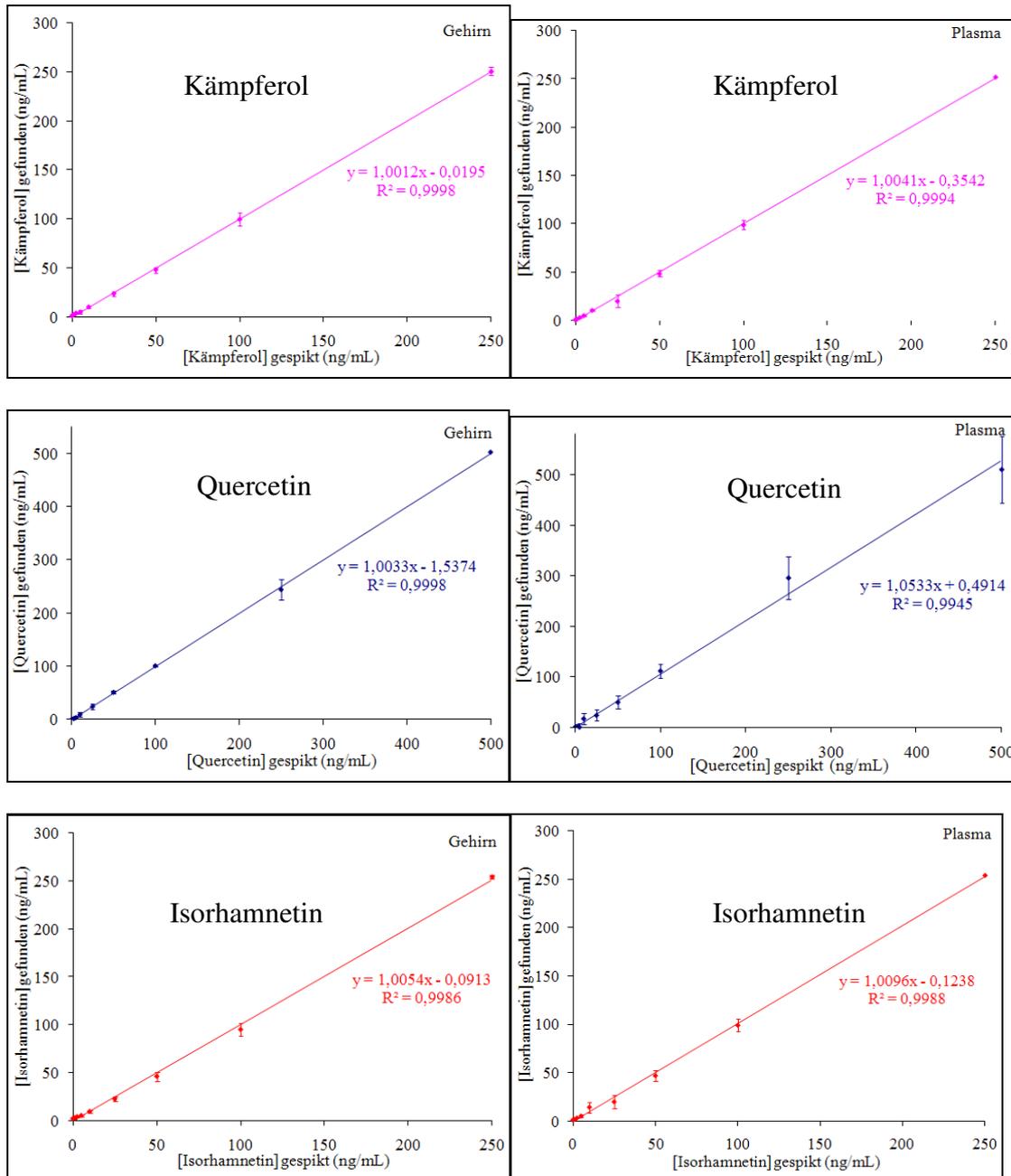


Abbildung 26. Ermittlung der Richtigkeit und Präzision (n=3).

Wenn die Methode richtig ist, muss die Steigung der Regressionsgeraden gemäß der Nullhypothese ( $H_0$ ,  $m = 1$ ) nahezu 1 betragen. Für die drei untersuchten Analyten war die Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% zutreffend. Dies bedeutet, dass die gefundene Konzentration ( $\bar{x}$ ) und der nominelle Wert ( $\mu$ ) nicht erheblich voneinander abweichen und infolgedessen die Methode für die Ermittlung der Richtigkeit

verwendet werden konnte. Da auch bei der statistischen Analyse des Y-Achsenabschnittes keine relevante Abweichung von Null entdeckt wurde, konnte gefolgert werden, dass die Methode keinen systematischen Fehler aufweist. Zusätzlich erfüllten auch die Messwerte die Präzisionskriterien (R.S.D. < 15% im Allgemeinen und R.S.D. < 20% beim LLOQ). Da die Methode den Akzeptanzkriterien für Richtigkeit und Präzision entspricht, ergibt ihre Verwendung eine hohe Genauigkeit.

### 2.1.3.7. Stabilität

Die Stabilität der Flavonoide im linearen Bereich der abschließend aufgearbeiteten Proben wurde sowohl bei Zimmertemperatur als auch nach zwei Einfrier-Auftau-Zyklen bestimmt. Die Berechnung erfolgte, indem die frisch hergestellten Proben mit denen nach der jeweiligen Behandlung verglichen wurden.

Bei Raumtemperatur ergab sich in den final aufgearbeiteten Plasma- und Hirnproben innerhalb einer Zeitdauer von 48 Stunden keine signifikante Degradation der Analyten. Ferner wurde festgestellt, dass die Plasma- und Hirnproben über zwei Wochen bei -20°C stabil blieben. Auch beim Vergleich der frisch hergestellten Proben mit den Konzentrationen nach einem und zwei Einfrier-Auftau-Zyklen wurde festgestellt, dass die Analyten mindestens 5 Tage lang stabil blieben. Die Validierungskriterien sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Validierungsparameter für die Bestimmung der Flavonoidglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin in Gehirn- und Plasmaproben.

	Hirn			Plasma		
	Quercetin	Kämpferol	Isorhamnetin	Quercetin	Kämpferol	Isorhamnetin
Spezifität	*	*	*	*	*	*
Bestimmungsbereich (ng/mL) <sup>a</sup>	2,5-500	0,125-250	0,125-250	0,125-500	0,125-250	0,125-250
LLOQ (ng/mL)	2,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Wiederfindung	78,6%	73,2%	69,1%	82,0%	98,5%	98,2%
Richtigkeit	99,7%	99,9%	99,5%	95,7%	99,6%	99,0%
Präzision (Wiederholbarkeit) <sup>b</sup>	7,0%	7,0%	6,4%	1,4%	6,2%	8,4%
Präzision (Reproduzierbarkeit) <sup>b</sup>	9,3%	9,4%	7,3%	9,2%	10,3%	12,7%
Stabilität	> 48 h	> 48 h	> 48 h	> 48 h	> 48 h	> 48 h

\* Die Kriterien wurden angemessen erfüllt.

<sup>a</sup> Die Determinationskoeffizienten waren in beiden Matrizen  $R^2 > 0,99$  für alle Analyten.

<sup>b</sup> Die Werte sind als relative Standardabweichung (R.S.D.) angegeben

### **3. BIOVERFÜGBARKEIT VON GINKGOFLAVONOIDEN IN RATTEN**

Auf Basis der entwickelten und validierten Analysenmethode wurde am Tiermodell (Sprague-Dawley Ratten) die Pharmakokinetik der Ginkgoflavonoide bzw. deren Metaboliten im Plasma und im ZNS nach oraler Gabe untersucht. Dabei wurden Einfach- wie auch Mehrfachgaben sowie unterschiedliche Dosierungen geprüft. In einem weiteren Experiment wurde das Verteilungsmuster der Ginkgoflavonoide in verschiedenen Gehirnarealen untersucht.

#### **3.1. Experimenteller Teil**

##### ***3.1.1. Haltungsbedingungen der Tiere***

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (Bescheinigungsnummer 35-9185.82/740/97, Regierungspräsidium Karlsruhe). Die männlichen Sprague-Dawley Ratten wurden von der Firma Janvier, Le-Genest St. Insel, Frankreich geliefert, waren 6-7 Wochen alt und wogen 200-220 g. Sie wurden mindestens 10 Tage lang unter kontrollierten Klimabedingungen (21-22°C Temperatur, 50-60% relative Feuchtigkeit), einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus und freiem Zugang zu Nahrung und Wasser in Macrolon®-Käfigen gehalten. Die letzten fünf Tage vor den jeweiligen Experimenten erhielten alle Tiere Flavonoide-freies Futter (Washout-Periode). Anschließend wurde der Ginkgoextrakt EGb 761 in einer Agar-Extrakt suspension (0,2% Agar, 10 mL/kg) oral über eine Schlundsonde verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppen erhielten nur 0,2% Agar 10 mL/kg.

##### ***3.1.2. Studie 1: Bioverfügbarkeit nach Einfach- und Mehrfachgabe***

In einer ersten Studie wurden die Konzentrationen der Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin nach einfacher bzw. mehrfacher Gabe (1x täglich über 8 Tage) von EGb 761 im Plasma und ZNS ermittelt. Als Einzeldosis wurde für diesen Versuch 600 mg/kg Körpergewicht pro Tag festgelegt, was 150 mg Flavonoiden entspricht. Diese Dosierung, welche in ähnlichem Maße in früheren Studien angewendet wurde (Watanabe et al., 2001), wurde von den Tieren gut vertragen. Dennoch sollte an

dieser Stelle angemerkt werden, dass die Dosis von 600 mg/kg Extrakt relativ hoch ist im Vergleich zur humanen, therapeutischen Dosis von 120-240 mg EGb 761 pro Tag.

### 3.1.2.1. Einfachgabe

Für diese Studie wurde den Ratten eine Einzeldosis von 600 mg/kg in 0,2% Agar suspendiertem EGb 761 verabreicht. Die Kontrollgruppe (Nullgruppe) erhielt nur 10 mL/kg 0,2% Agar. Zu fest gelegten Zeitpunkten, d.h. 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 Stunden nach der Verabreichung, wurden jeweils Proben von 6 Tieren (n=6) entnommen.

### 3.1.2.2. Mehrfachgabe

Der Tierversuch für die Ermittlung der *Steady-State*-Kinetik wurde analog zur Einfachgabe durchgeführt, diesmal erhielten die Tiere jedoch 8 Tage lang 1x täglich 600 mg/kg Körpergewicht EGb 761. Die Probenentnahme von jeweils 6 Tieren (n=6) erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten wie bei der Einfachgabe, d.h. 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 Stunden nach der letzten Verabreichung. Die Proben der Tiergruppe t= 0 wurde 24 Stunden nach der 7. Verabreichung genommen.

### 3.1.3. Probenentnahme

Die Ratten wurden zu den genannten Probenentnahmezeiten mit CO<sub>2</sub> betäubt und getötet. Der weitere Verlauf der Probenentnahme ist in Abbildung 27 visualisiert.

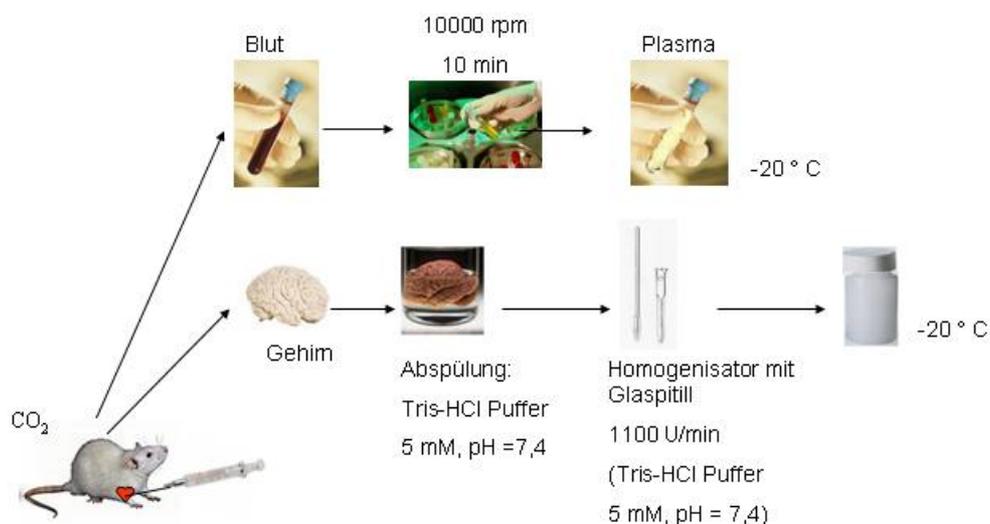


Abbildung 27. Abfolge der Probenentnahme.

Zuerst wurden Blutproben mittels Herzpunktion entnommen und in Li-Heparin-Monovetten (Fa. Sarstedt, 16 I.U.Heparin/mL Blut) gesammelt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (3774× g, 4 °C, 10 Minuten) und die so erzeugten Plasmaproben bei –20 °C gelagert. Nun wurde das Gehirn jeder Ratte ohne den Gehirnstamm entnommen, sorgfältig mit eiskaltem Tris-HCl-Puffer gewaschen, gewogen und mit einem „Potter-S“ Homogenator mit einem Glaspistill der Firma Braun bei ca. 1100 U/min in 5 mM Tris-HCl-Puffer pH = 7,4 (100 mg Gehirn/ 1 mL Puffer) homogenisiert. Die so erhaltenen Plasma- und Gehirnproben wurden bis zur Analyse bei –20 °C gelagert.

### 3.1.4. Studie 2: Dosierungseffekt und Verteilung im ZNS

Zur Ermittlung des Verteilungsmusters der Ginkgoflavonoide bzw. deren Metaboliten in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis wurde eine weitere Tierstudie durchgeführt. Bei diesem Experiment wurde den Tieren, nach einer 5-tägigen Washout-Periode mit einer Flavonoid-freien Diät, acht Tage lang oral entweder 600 mg/kg EGb 761 (n = 6) oder 100 mg/kg EGb 761 (n = 6) verabreicht. Die Kontrollgruppe (n = 2) erhielt 0,2% Agar.

Vier Stunden nach der letzten Verabreichung, wurden die Gehirne entnommen und die Areale Hippocampus, Striatum, frontaler Cortex und Kleinhirn präpariert. Der Rest des Gehirns wurde ebenfalls analysiert. Die Proben jedes einzelnen Hirnareals wurden separat homogenisiert und anschließend nach der in der Probenaufarbeitung beschriebenen Methode hydrolysiert und durch HPLC-FD analysiert (s. Abschnitt 2.1.1.1.). Zusätzlich wurden Plasmaproben entnommen und analysiert. Das Tierstudien-Design ist z in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9. Tierstudien-Design.

	Design	Dosis EGb 761	Dauer	Probennahme
Pharmakokinetik	Einfachgabe	Einzel dosis 600 mg/kg (n = 6)	1 Tag	1, 2, 4, 8, 24, 72 h nach der Gabe
	Mehrfachgabe	1 Mal täglich 600 mg/kg (n = 6)	8 Tage	1, 2, 4, 8, 24, 72 h nach der letzten Gabe
ZNS-Verteilung	Mehrfachgabe	1 Mal täglich 600 mg/kg (n = 6)	8 Tage	4 h nach der letzten Gabe
	Mehrfachgabe	1 Mal täglich 100 mg/kg (n = 6)	8 Tage	4 h nach der letzten Gabe

### 3.2. Ergebnisse

#### 3.2.1. Studie 1: Pharmakokinetik nach Einfach- und Mehrfachgabe

Im Vorfeld der Tierstudie musste der Gesamtflavonoidgehalt im Extrakt EGb 761 bestimmt werden, um im Folgenden die pharmakokinetischen Parameter exakt berechnen zu können. Dazu wurde der Extrakt einer sauren Hydrolyse (1M HCl, 90°C, 60 Minuten, s. Abbildung 28) unterzogen, um alle Flavonoidglykoside zu spalten und anschließend die Aglyka mittels HPLC-FD bestimmen zu können.

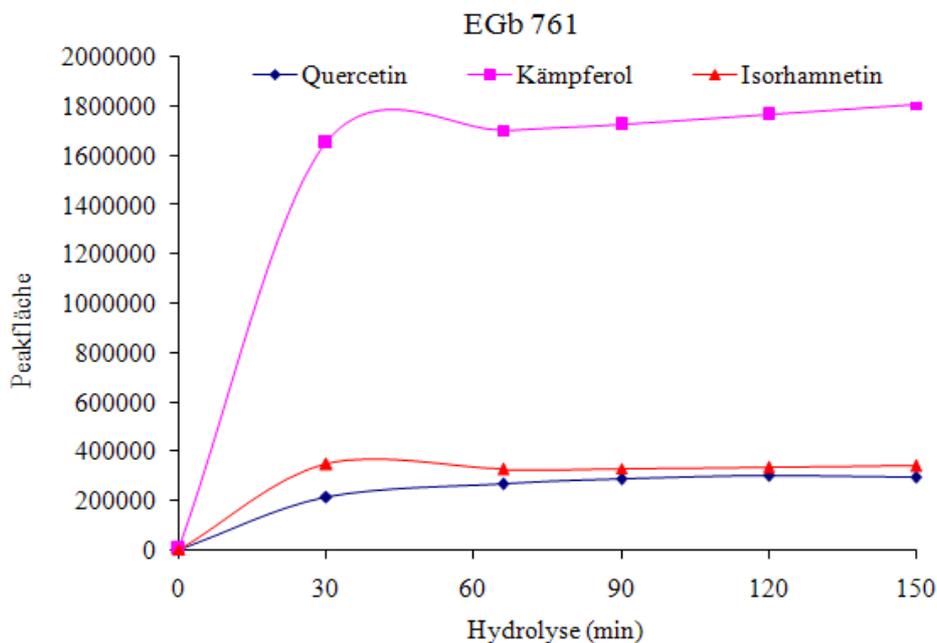


Abbildung 28. Optimierung der sauren Hydrolysezeit für die Analyse der Aglyka aus dem EGb 761 Extrakt.

Auf diese Weise konnte im Extrakt (n=3), folgender Gehalt an Aglyka ermittelt werden.

Tabelle 10. Flavonoidengehalt (als Aglyka) von EGb 761.

	Gehalt	R.S.D
Quercetin	6,1%	5,5%
Kämpferol	4,1%	2,6%
Isorhamnetin	1,1%	3,9%

Aus diesem Aglykagehalt ergibt sich ein Gesamtflavonoidgehalt von 28,41% berechnet als Flavonoidglykoside mit einer mittleren Molmasse von Mr 756,7 (Sticher, 1992; DAB, 2006)

Eine vorausgehende Literaturrecherche zeigte, dass die Pharmakokinetik der Ginkgoflavonoide bisher kaum untersucht wurde, d.h. bisher lediglich eine Pilotstudie mit zwei Probanden und eine Bioäquivalenzstudie mit 18 gesunden Freiwilligen publiziert wurden (Nieder, 1991; Wojcicki et al., 1995). Beide Studien waren nicht darauf angelegt, umfangreiche pharmakokinetische Daten zu erheben.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Tierstudien zur Einfach- und Mehrfachgabe sowohl im Plasma wie auch im ZNS dargestellt.

### 3.2.1.1. Einfachgabe

#### 3.2.1.1.1. Plasma

Die Analyse der Plasmaproben nach oraler Gabe von 600 mg/kg EGb 761 führte zu den in Abbildung 29 dargestellte Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven für die Ginkgo Flavonoidmetaboliten mit den Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin. Die abgebildeten Werte wurden ermittelt, indem zu jedem Messpunkt der statistische Mittelwert aus den sechs Tieren (n=6) ermittelt wurde. Die Y-Fehlerindikatoren stellen den Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.) dar.

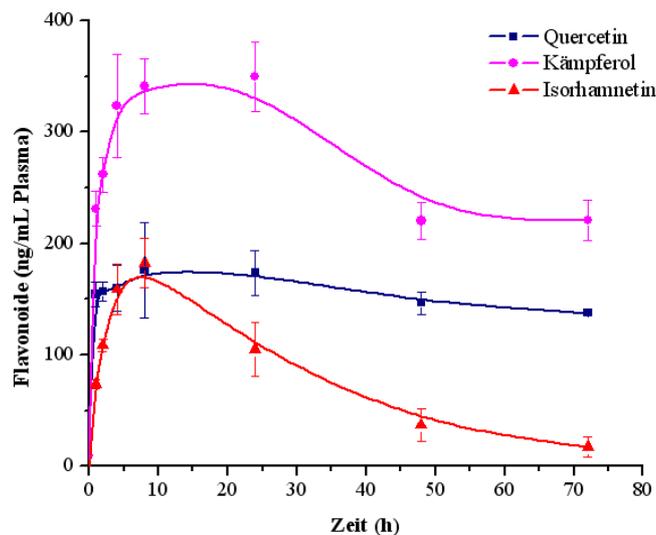


Abbildung 29. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im Plasma nach Einfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 (n=6).

Es ist augenscheinlich, dass die Kämpferolmetaboliten die mit Abstand höchsten Plasmaspiegel erreichten. Der maximale Plasmaspiegel wurde hierbei innerhalb von 8 Stunden nachgemessen und betrug 341 ng/mL. Die Plasmakonzentration blieb weitere 16 Stunden konstant auf diesem sehr hohen Niveau und nahm erst dann ab. Selbst nach 72 Stunden konnte allerdings noch ein signifikanter Plasmaspiegel bestimmt werden.

Die Kurve für Isorhamnetin/Tamarixetin sieht vergleichbar aus, die maximale Plasmakonzentration betrug hier allerdings nach 8 Stunden nur noch etwa 183 ng/mL. 72 Stunden nach der Verabreichung waren schließlich nur noch 9,5% des  $C_{\max}$  im Plasma vorhanden.

Die Plasmakonzentration der Quercetinmetaboliten erhöhte sich rasch und erreichte den maximalen Wert von 176 ng/mL bereits innerhalb von 8 Stunden nach der Verabreichung. Dieses Ergebnis ( $T_{\max}$ ) für Quercetin steht im Einklang mit den Literaturdaten (Erlund et al., 2000). Anschließend verringerte sich die Plasmakonzentration im beobachteten Zeitrahmen nur geringfügig, so dass am Ende immer noch 78% der maximalen Plasmakonzentration vorhanden war.

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter aus Plasmadaten eignet sich zunächst die Nicht-Kompartiment-Method. Dabei wird die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve empirisch bestimmt.

Für jeden Messpunkt ( $n=6$ ) wurden  $C_{\max}$  und  $T_{\max}$  direkt aus den Konzentrations-Zeit-Kurven bestimmt. Hierfür wurde jeweils die Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve von Zeitpunkt 0 bis  $t = 72$  h ( $AUC_{0-72h}$ ) mit der Trapezregel berechnet. Anschließend wurde die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante ( $\lambda_z$ ) per Regressionsanalyse aus der Steigung der log Plasmakonzentration-Zeit-Kurven ermittelt und zur Feststellung der terminalen Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) verwendet.

Die Gesamtkörper-Clearance ( $Cl_T$ ) und das Verteilungsvolumen ( $V_z$ ) wurden mittels der Formeln  $Cl_T = \text{Dosis}/AUC_{0-\infty}$  bzw.  $V_z = Cl_T/\lambda_z$  berechnet. Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt  $t$  bis  $\infty$  ( $AUC_{t-\infty}$ ) wurde mit Hilfe der Formel  $AUC_{t-\infty} = C_t / \lambda_z$  ermittelt und anschließend zur Berechnung der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, von  $AUC_{0-\infty}$  (Zeitpunkt 0 bis  $\infty$ ) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11. Pharmakokinetische Parameter der Ginkgo Flavonoide, berechnet als Aglyka, nach oraler Einmalgabe von 600 mg/kg EGb 761 Extrakt im Rattenmodell.

Parameter	Einheit	Quercetin	Kämpferol	Isorhamnetin/ Tamarixetin
Dose	mg	9,7	6,5	1,7
C <sub>max</sub>	ng/mL	176	341	183
T <sub>max</sub>	h	8	8	8
AUC <sub>0-72 h</sub>	ng·h/mL	11.285	19.947	5.734
AUC <sub>0-∞</sub>	ng·h/mL	43.532	46.673	6.198
λ <sub>z</sub>	1/h	0,00385	0,00954	0,03670
t <sub>1/2</sub>	h	*	*	19
Cl <sub>T</sub>	mL/min	0,0037	0,0023	0,0147
V <sub>z</sub>	L	0,058	0,015	0,008

\*Diese Werte konnten nicht errechnet werden, aufgrund der nach 71 h zu hohen Konzentration.

Die Analyse der Plasmaproben der Kontrollgruppe (Nullgruppe) hingegen, die nur eine Flavonoid-freie-Diät erhielten, zeigte keine Signale an den Retentionszeiten der untersuchten Analyten.

### 3.2.1.1.2. Gehirn

Die Analyse der ZNS-Proben nach oraler Verabreichung von 600 mg/kg EGb 761 brachte nur für die Metaboliten mit Kämpferolaglykon und mit Isorhamnetin/Tamarixetin-Aglykon positive Ergebnisse. Die Konzentration der Metaboliten mit Quercetingrundgerüst lag im ZNS unter der LLOQ der analytischen Methode. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse für Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin dargestellt, wobei die Konzentration der Analyten in Relation zur gemessenen Proteinmenge im ZNS gesetzt wird (Lowry et al., 1951).

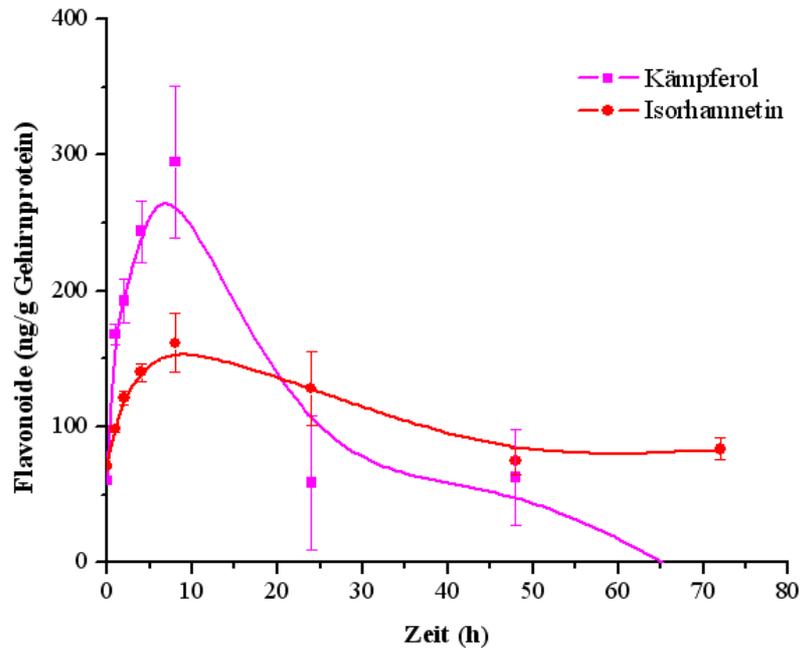


Abbildung 30. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im ZNS nach Einfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 (n=6).

Wie beim Plasma wurden auch im ZNS die maximalen Konzentrationen nach acht Stunden erreicht und entsprachen 293 bzw. 161 ng/g Protein im Gehirn für Kämpferol bzw. Isorhamnetin/Tamarixetin. Auffallend ist, dass die Konzentration im ZNS bei Kämpferol deutlich über der von Isorhamnetin/Tamarixetin lag, jedoch Isorhamnetin/Tamarixetin über einen längeren Zeitraum, selbst nach 72 Stunden, in höherer Konzentration im ZNS nachgewiesen wurden. Die Konzentration von Kämpferol lag 24 Stunden nach der Verabreichung bereits unterhalb der LLOQ. In diesem Experiment wurde kein Quercetin nachgewiesen.

Gegenüber der Versuchsgruppe zeigte die Analyse der ZNS-Proben der Kontrollgruppe (Nullgruppe), die nur eine Flavonoid-freie-Diät erhielten, keine Signale an den Retentionszeiten der untersuchten Analyten.

### 3.2.1.2. Mehrfachgabe

#### 3.2.1.2.1. Plasma

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach Einfachgabe des Extraktes legten die Erwartung nahe, dass nach Mehrfachgabe deutlich höhere Plasmakonzentrationen messbar sind. Diese Vermutung wurde in erster Linie gestützt durch die relativ hohen Plasma-

konzentrationen, die noch selbst 24 Stunden nach Verabreichung gemessen wurden (s. Abbildung 29, Seite 61).

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe der drei Analyten im Plasma am 8. Tag, nach täglicher Gabe von 600 mg/kg EGb 761 sind in Abbildung 31 visualisiert.

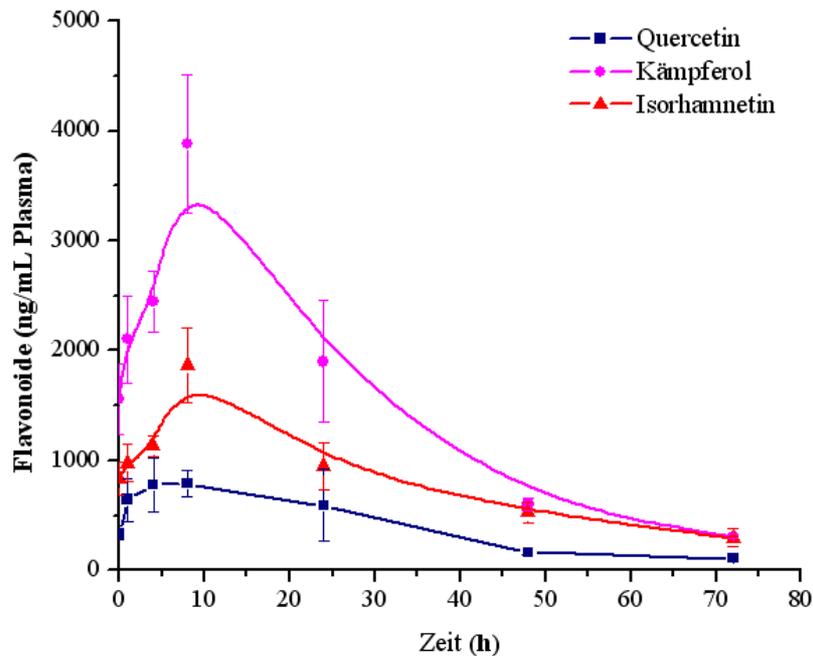


Abbildung 31. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/ Tamarixetin im Plasma nach 8-tägiger Mehrfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 (n=6).

Dabei zeigten sich maßgeblich höhere maximale Plasmakonzentrationen für alle drei Aglyka. Besonders deutlich ausgeprägt war dieser Effekt bei Kämpferol und bei Isorhamnetin/Tamarixetin. Hier waren die maximalen Plasmakonzentration um den Faktor 11,5 bzw. 10 höher als bei der Einfachgabe. Bei den Quercetinmetaboliten konnte hingegen eine Steigerung um den Faktor 4,5 im Vergleich zur Einfachgabe beobachtet werden. Dies ist anschaulich in Abbildung 32 dargestellt.

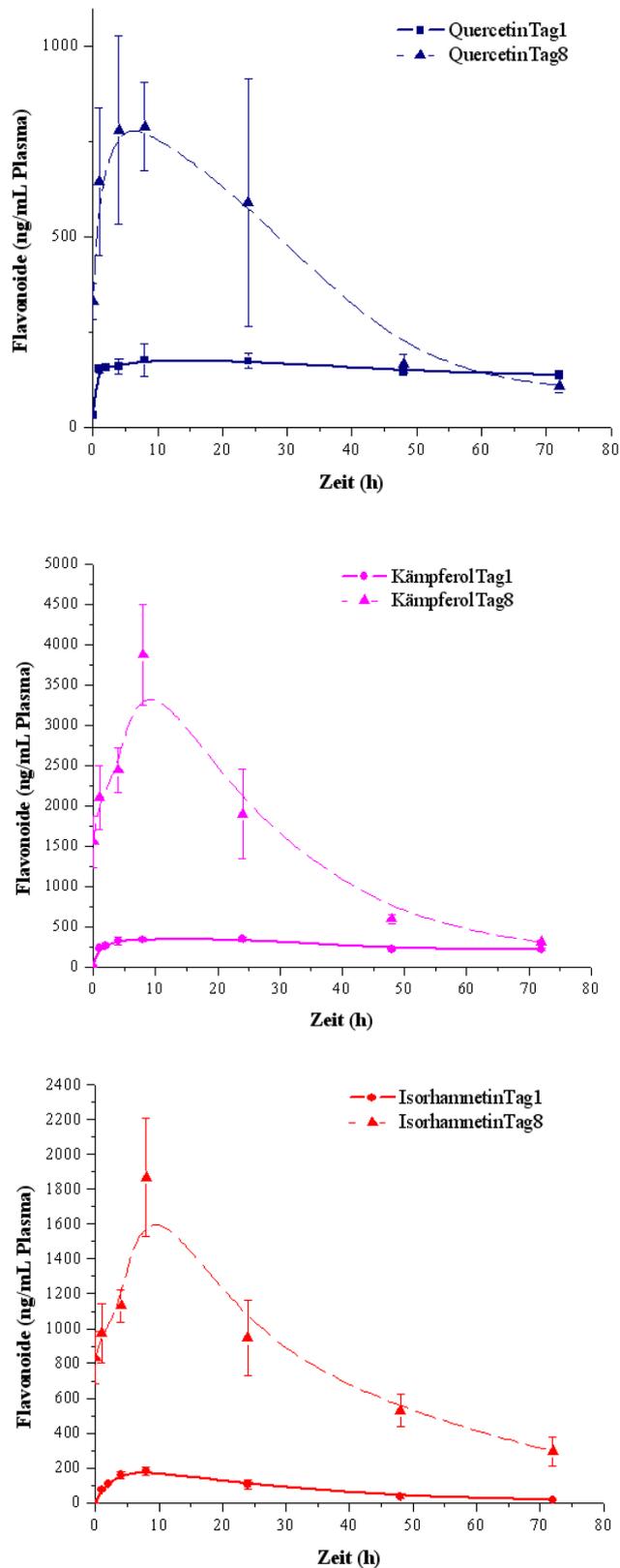


Abbildung 32. Vergleich des Konzentrations-Zeit-Verlauf von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im Plasma nach Einfachgabe [Tag 1] und 8-tägiger Mehrfachgabe [Tag8] von 600 mg/kg EGb 761.

Wie bereits nach der Einfachgabe, so konnte auch nach der Mehrfachgabe von 600 mg/kg des standardisierten Extraktes EGb 761 maximale Plasmakonzentrationen innerhalb von 8 Stunden bestimmt werden. Die errechneten Halbwertzeiten von rund 18 bis 24 Stunden erklären auch die starke Zunahme der Plasmakonzentration im Zuge der wiederholten Verabreichung. So konnten selbst 72 Stunden nach der letzten Gabe noch 7-15% der Maximalkonzentration im Plasma gemessen werden. Weitere pharmakokinetische Parameter sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12. Pharmakokinetische Parameter der Ginkgo Flavonoide, berechnet als Aglyka, nach oraler Mehrfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 Extrakt über acht Tage im Rattenmodell.

Parameter	Einheit	Quercetin	Kaempferol	Isorhamnetin/ Tamarixetin
Dose	mg	85,4	57,4	15,4
C <sub>max</sub>	ng/mL	789	3.878	1.868
T <sub>max</sub>	h	8	8	8
AUC <sub>0-72 h</sub>	ng·h/mL	29.170	108.478	60.141
AUC <sub>0-∞</sub>	ng·h/mL	32.668	116.354	70.402
λ <sub>z</sub>	1/h	0,0310	0,0394	0,0288
t <sub>1/2</sub>	h	22	18	24
Cl <sub>T</sub>	mL/min	0,0436	0,0082	0,0036
V <sub>z</sub>	L	0,084	0,013	0,008

### 3.2.1.2.2. Gehirn

Nach Mehrfachgabe über einem Zeitraum von 8 Tage von 600 mg/kg EGb 761 zeigte sich auch im ZNS eine signifikante Zunahme der Ginkgoflavonoidmetaboliten, wenngleich dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt war wie im Plasma (siehe Abbildungen 33). Wie schon nach der Einfachgabe, konnten nur Kämpferol- und Isorhamnetin/Tamarixetin-Metaboliten quantifiziert werden. Deren Konzentration im ZNS war vergleichbar und erhöht sich, im Vergleich zur Einfachgabe, lediglich um den Faktor 2. Nach Erreichen der maximalen ZNS-Konzentration wurden sowohl Kämpferol wie auch Isorhamnetin/Tamarixetin kontinuierlich ausgeschieden. 72 Stunden nach der letzten Gabe konnten ca. 10 bis 15% der maximalen ZNS-Konzentration ermittelt werden. In diesem Experiment wurde auch kein Quercetin nachgewiesen.

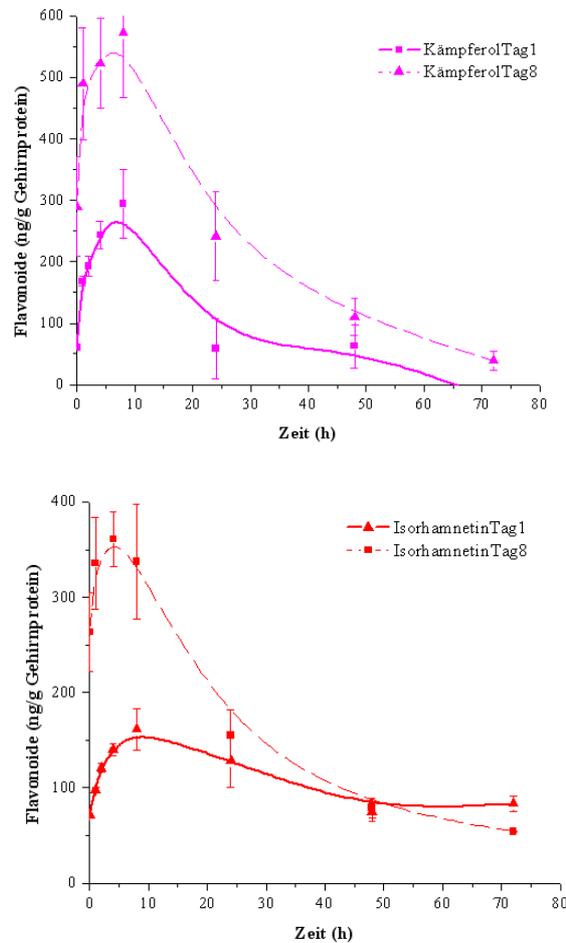


Abbildung 33. Vergleich des Konzentrations-Zeit-Verlauf von Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im Gehirn nach Einfachgabe [Tag 1] und 8-tägiger Mehrfachgabe [Tag8] von 600 mg/kg EGb 761.

### 3.2.2. Studie 2: Verteilung im ZNS und Dosierungseffekt.

Die Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Ginkgoflavonoide im Plasma und ZNS haben zu dem Ergebnis geführt, dass eine Mehrfachgabe von 600 mg/kg Extrakt über 8 Tage zu sehr hohen Konzentrationen im Plasma wie auch im ZNS führte. In einer weiteren Studie sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Ginkgoflavonoide nach oraler Gabe in bestimmten Gehirnarealen bevorzugt nachweisbar sind. Parallel dazu wurde der Tatsache, dass die Dosis von 600 mg/kg vergleichsweise hoch ist, Rechnung getragen und zusätzlich eine zweite, geringere Dosis von 100 mg/kg Extrakt eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden die Plasmakonzentrationen der Ginkgoflavonoide nach Mehrfachgabe beider Dosierungen verglichen (siehe Abbildung 34). Die Probenentnahme erfolgte 4 Stunden nach der letzten Gabe.

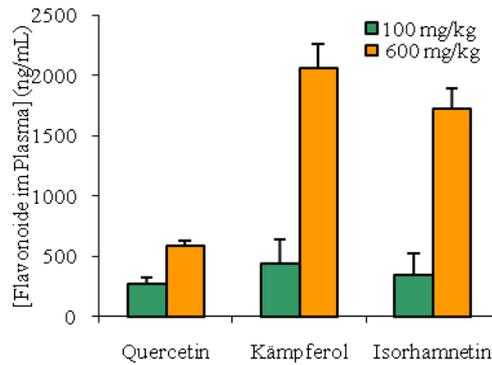


Abbildung 34. Vergleich der Plasmakonzentration von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin nach 8-tägiger Mehrfachgabe von 600 bzw. 100 mg/kg EGb 761.

Die Plasmakonzentrationen nach Gabe von 600 mg/kg sind demnach im Vergleich zur 100 mg/kg Dosierung für Quercetin ungefähr doppelt so hoch und die für Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin rund 4-mal höher. Eine vergleichbare Abhängigkeit der Dosierung wurde auch an gesunden Freiwilligen bei der Verabreichung von 50, 100 und 300 mg LI 1370-Extrakt gefunden (Nieder, 1991), allerdings waren die gemessenen Konzentrationen etwas geringer.

Im zweiten Teil dieses Projektes wurde überprüft, ob die Ginkgoflavonoide auch bei niedrigerer Dosierung im ZNS nachgewiesen werden können. Dabei wurde jedoch nicht wie im vorangegangenen Experiment das gesamte Gehirn untersucht, sondern verschiedene Gehirnareale getrennt voneinander analysiert und die ZNS-Konzentrationen nach Gabe von 600 mg/kg und 100 mg/kg des Extraktes miteinander verglichen. Abbildung 35 zeigt die relativen Gewichtsanteile der untersuchten Gehirnareale in Gewichtsprozent. Die Werte entsprechen dem Durchschnitt von 14 Tieren, wobei die relative Standardabweichung bei allen Arealen weniger als 10% betrug. Die einzige Ausnahme hiervon bildete der frontale Cortex, mit einer R.S.D. von 14%.

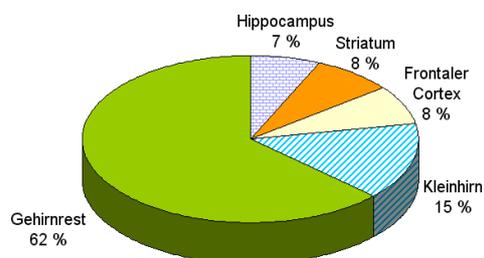


Abbildung 35. Relativer Gewichtsanteil unterschiedlicher Hirnareale von 6 bis 7 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley Ratten (n=14).

Hippocampus, Striatum und frontaler Cortex umfassen jeweils rund 8% der Gesamtmasse des Gehirngewebes und sind damit vergleichsweise klein. Das Kleinhirn ist ungefähr zweimal größer als die ersten drei Regionen. Der übrige Teil des Gehirns entspricht ungefähr 60%. Die Ergebnisse der Verteilung der Flavonoidaglyka in den o.g. Gehirnbereichen sind in Abbildung 36 dargestellt.

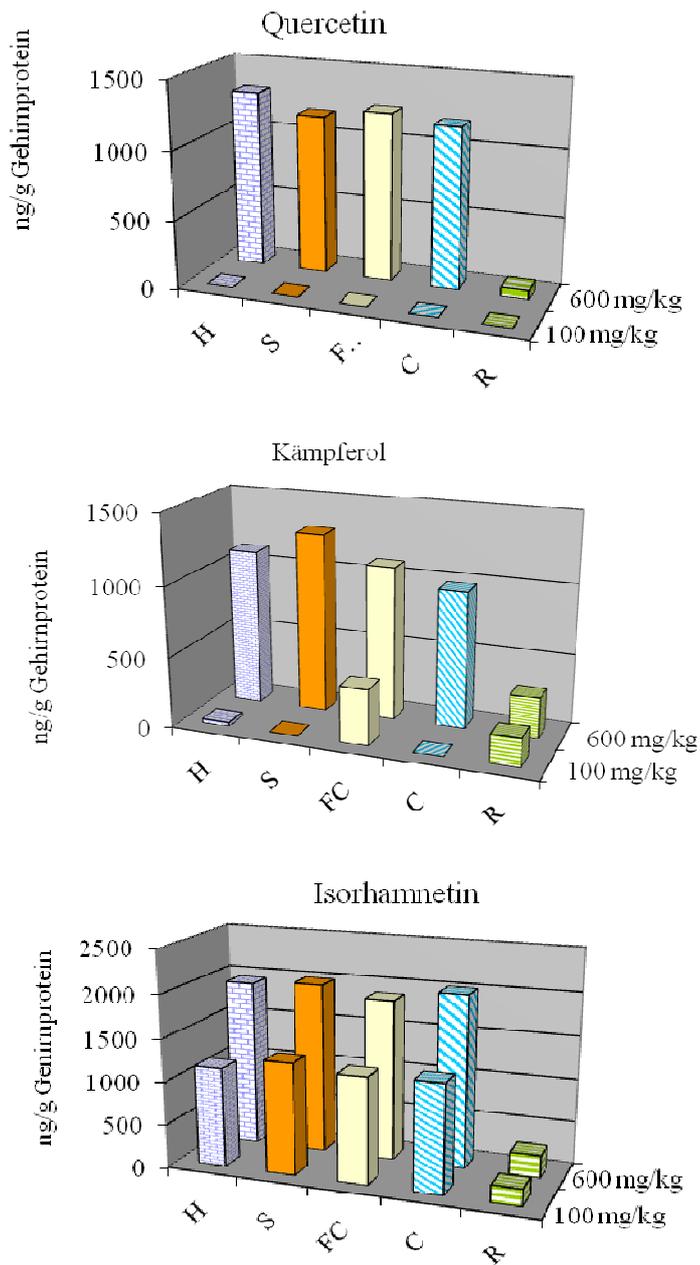


Abbildung 36. Verteilung von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin im Gehirn nach 8-tägiger Mehrfachgabe von 600 bzw. 100 mg/kg EGb 761. Probenentnahme 4 Stunden nach der letzten Gabe.

Obwohl Quercetin bei den Untersuchungen des gesamten Gehirns nicht nachgewiesen werden konnte, gelang der Nachweis interessanterweise nach Gabe von 600 mg/kg EGb 761 in einzelnen Teilen des Gehirns. Konkret konnte Quercetin in vergleichsweise hohen Konzentrationen im Hippocampus (H), Striatum (S), frontalem Cortex (FC) und im Kleinhirn (K) nachgewiesen werden, wohingegen im verbleibenden Rest des Gehirns die Quercetinkonzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Diese Tatsache könnte die Ursache dafür gewesen sein, dass Quercetin in den vorangegangenen Studien nicht im ZNS nachgewiesen werden konnte. Man könnte hier auch von einem Verdünnungseffekt sprechen, welcher eintritt, wenn das gesamte Gehirn untersucht wird, da Quercetin hauptsächlich in den kleinen Gehirnarealen (Hippocampus, frontaler Cortex, Striatum und Kleinhirn) anzutreffen ist.

Die dargestellten Verteilungsmuster von Kämpferol sind in der höheren Dosierung (600 mg/kg EGb 761) mit denen von Quercetin vergleichbar. Kämpferol, von dem nur sehr kleine Mengen im Rest des Gewebes gefunden wurden, neigt dazu, sich bei der höheren Dosierung in den kleinen Bereichen des Gehirns in einer ähnlichen Weise wie Quercetin zu verteilen. Im Unterschied dazu, konnte Kämpferol auch bei einer niedrigeren Dosierung von 100 mg/kg nachgewiesen werden. Bei dieser Dosierung konnte rund zwei Drittel des Analytes im frontalen Cortex, etwa 30% im Resthirn und eine geringe Menge im Hippocampus bestimmt werden. Die Gesamtkonzentration an Kämpferol betrug bei einer Dosierung von 100 mg/kg nur etwa 25% von derjenigen, die bei einer Dosierung von 600 mg/kg gefunden wurde.

In Hinblick auf Isorhamnetin/Tamarixetin zeigte sich bei beiden Dosierungen ein vergleichbares Verteilungsmuster. Auch hier wurden die höchsten Konzentrationen an Isorhamnetin/Tamarixetin in den folgenden Bereichen gemessen: Hippocampus, Striatum, frontaler Cortex und Kleinhirn. Dagegen wurde nur ein kleiner Anteil von etwa 3% im übrigen Teil des Gehirns gefunden. Obwohl die Verteilung für beide Dosierungen ähnlich ist, ist es wichtig hervorzuheben, dass die Menge an Isorhamnetin/Tamarixetin, die bei einer Dosierung von 100 mg/kg EGb 761 gefunden wurde, ca. 50% von derjenigen betrug, die bei einer Dosis von 600 mg/kg EGb 761 gefunden wurde.

## 4. PROTEOMICSSTUDIE

Ergebnisse der Bioverfügbarkeitsstudien aus Kapitel 3 haben gezeigt, dass Ginkgoflavonoide bzw. deren Metaboliten in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in bestimmten Hirnarealen nachgewiesen werden können. Es ist deswegen möglich, dass diese Substanzen an der Gesamtwirkung des Ginkgoextraktes EGb 761 beteiligt sind. Die genauen molekularen Mechanismen, die für die Wirkung des Extraktes verantwortlich sind, sind nicht ausführlich geklärt.

Basierend auf verschiedene Studien, die eine Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskettenaktivität durch EGb 761 auf Ebene der Komplexen I und III andeuten (Janssens et al., 1999; Janssens et al., 2000; Tendi et al., 2002), wurde in dieser Proteomicsstudie die Expression von mitochondrialen Atmungskettenkomplexen im frontalen Cortex (eines bei Alzheimer besonders betroffenes Areal) nach 28-tägiger Gabe von EGb 761 an Ratten untersucht. Hierfür wurden drei Schritte durchgeführt. Zuerst wurden die Membranproteinkomplexe der Atmungskette (Komplex I–V) aus dem frontalen Cortex der Ratten gereinigt und getrennt. Dies geschah unter der Verwendung von ein-dimensionalen Gelelektrophoresen (BN- und hrCN-PAGE). Im nächsten Schritt wurden die Untereinheiten der Komplexe in der 2. Dimension durch SDS-Gelelektrophorese (BN/hrCN-SDS-PAGE) getrennt. Abschließend wurde die Proteinexpression der mit EGb 761 gefütterten Ratten durch Densitometrie ermittelt und mit den Ergebnissen der Proteinexpression der entsprechenden Kontrolltiere verglichen.

### 4.1. Theoretische Grundlagen

#### 4.1.1. *Mitochondrienaufbau*

Mitochondrien sind Organellen der Zellatmung, die über die Atmungskette den Energiespeicher und -überträger ATP synthetisieren. Zudem sind sie wesentlich am Kohlenhydrat-, Fett- und Aminosäurenstoffwechsel beteiligt und integrieren Stoffwechselprozesse wie den Citratzyklus und die Betaoxidation von Fettsäuren. Die im Zellstoffwechsel anfallenden, energiereichen reduzierten Produkte Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH<sub>2</sub>) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH<sub>2</sub>) werden in den Mitochondrien für die ATP-Synthese genutzt.

Wie aus Abbildung 37 zu ersehen ist, bestehen Mitochondrien aus einer äußeren und einer inneren Membran. Der innerhalb der inneren Membran befindliche Raum heißt Matrixraum. Der von äußerer und innerer Membran umschlossene Raum heißt Zwischen- oder Intermembranraum und ist durch zahlreiche Einstülpungen der inneren Membran gekennzeichnet.

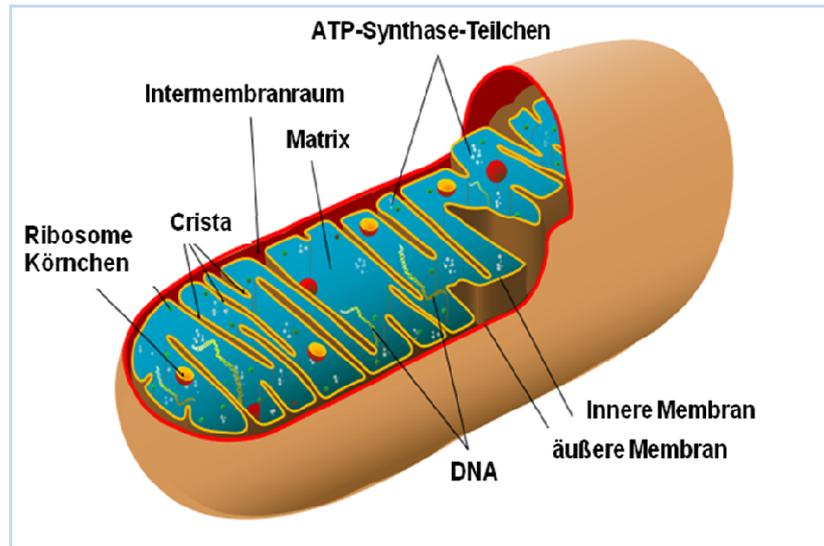


Abbildung 37. Aufbau einer Mitochondrie.

Die äußere Membran ist durch Membrankanäle relativ permeabel. Die innere Membran ist undurchlässig und besteht zu 20% aus Lipiden und zu 80% aus Proteinen, welche größtenteils konstitutionelle Bestandteile der Atmungskette und verschiedener Transportsysteme sind.

In der Atmungskette, die auch Elektronentransportkette genannt wird, findet die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS)/Atmungskettenphosphorylierung statt. Sie ist ein wichtiger Teil des Energiestoffwechsels der meisten Lebewesen. Als letzter Schritt beim Glucoseabbau bildet sie die Grundlage für die Synthese des energieäquivalenten ATP. Sie besteht aus einer Kette von nacheinander geschalteten biochemischen Redoxreaktionen, die durch unterschiedliche Enzymkomplexe ausgeführt werden. In den meisten Organismen, besteht die Atmungskette aus dem ATP-Synthase-Komplex (Komplex V) und den vier Oxidoreduktase-Komplexen: I) NADH-Ubichinon Oxidoreduktase, II) Succinat-Ubichinon Oxidoreduktase, III) Ubichinon-Cytochrom c Oxidoreduktase, IV) Cytochrom-c Oxidase (auch Ferrocyclochrom c Oxidase genannt). Die Proteinkomplexe der Atmungskette sind in Abbildung 38 dargestellt.

Einige dieser Komplexe enthalten Flavinnucleotide, Häm, Eisen und Kupfer. Die Atmungskettenkomplexe befinden sich alle innerhalb der inneren Membran der Mitochondrien. Außerdem sind sie durch die mobilen Träger Ubichinon (auch Coenzym Q genannt) und Cytochrom c verbunden.

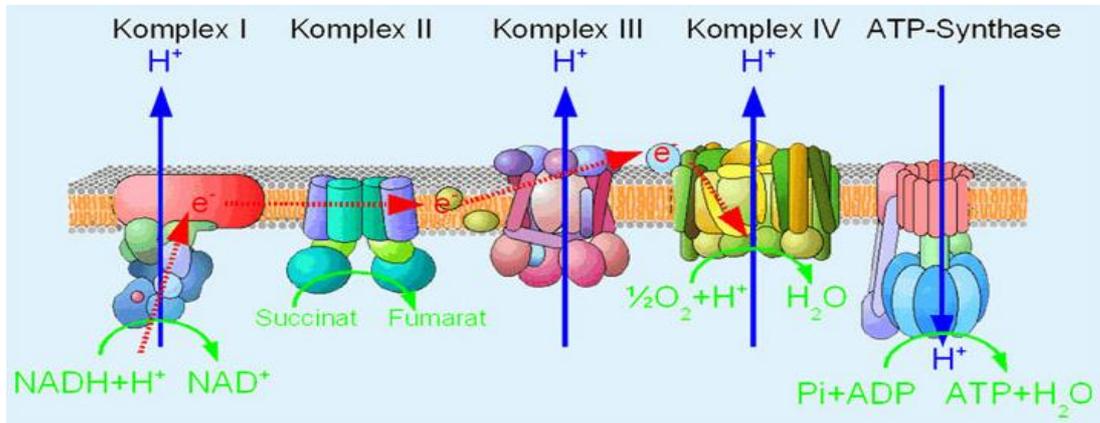


Abbildung 38. Atmungskette der Proteinkomplexe.

Die mitochondrialen Proteinkomplexe bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl an Untereinheiten, die von zwei verschiedenen Genomen, nukleäre (nuk) und mitochondriale (mt) Desoxyribonukleinsäure (DNS) kodiert werden. Komplex I bildet mit 46 Untereinheiten und einer Masse von rund 1 MDa die größte funktionelle Einheit beim Säuger (Carroll et al., 2005). Die weiteren funktionellen Einheiten sind bei Komplexen II, III, IV bzw. V aus 4, 11, 13 bzw. 16 Untereinheiten zusammengesetzt (Schägger et al., 1986; Kadenbach et al., 1991; Walker et al., 1991). Die mitochondriale DNS, welche sich im Matrixraum befindet, kodiert nur für eine geringe Anzahl der mitochondrialen Strukturproteine, u.a. Untereinheiten der Atmungskettenenzyme (Attardi and Schatz, 1988).

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die stöchiometrische Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe (Rinderherz, mitochondriale OXPHOS) und deren Untereinheiten.

Tabelle 13. Zusammensetzung der einzelnen Atmungskettenkomplexe.

Komplex	Enzym	Untereinheiten	mtDNS	nukDNS	KDa
I	NADH:Ubichinone Oxidoreduktase	46	7	39	1.000
II	Succinat:Ubichinon Oxidoreduktase	4	0	4	130
III	Ubichinon:Ferrocycytochrom c Oxidoreduktase	11	1	10	490
IV	Cytochrom c Oxidase	13	3	10	200
V	F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase	16	2	14	700
Summe		90	13	77	

#### 4.1.1.1. Atmungskettenfunktion

In der Atmungskette wird vorwiegend das energiereiche Substrat NADH mit Sauerstoff oxidiert, wobei Wasserstoff entsteht und Energie frei gesetzt wird (-219 kJ pro Mol NADH). Da die freigesetzte Energie aufgrund ihrer Menge nicht auf einmal nutzbar ist, wird die Reaktion in kleinere Schritte aufgeteilt.

Dies gelingt, indem der Wasserstoff bzw. die Elektronen über einige Zwischenreaktionen schrittweise von einem System mit negativerem Redoxpotenzial (NADH oder FADH) zu einem System mit positiverem Redoxpotenzial (Sauerstoff) geführt werden. Funktionell geschieht dies über die einzelnen Enzyme der Atmungskette. Komplex I und II übertragen Elektronen von NADH<sub>2</sub> oder FADH<sub>2</sub> auf Ubichinon, das in der inneren Mitochondrienmembran eingelagert ist. Komplex III überträgt Elektronen von Ubichinon zu Cytochrom c. Dieses kleine Protein befindet sich in dem Raum zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienmembrane. Schließlich überträgt Komplex IV die Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff. Auf diese Weise werden die Energiemengen effektiver an endogene Reaktionen und den Transport von Protonen in den Intermembranraum gekoppelt.

Der erzeugte Protonengradient d.h. das Gefälle hoher Wasserstoffionenkonzentration im Zwischenmembranraum und niedriger Konzentrationen im Matrixraum, kann für das Katalysieren der ATP-Bildung durch die Phosphorylierung von ADP im Komplex V verwendet werden (Boekema and Braun, 2007).

### 4.1.2. Proteintrennung

Die Trennung der Atmungskettenkomplexe erfolgte in zwei Schritten unter Verwendung einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-GE). In der ersten Dimension wurden die fünf Komplexe der Atmungskette durch eine native Gelelektrophorese getrennt. Dabei kamen zwei Varianten zum Ansatz: 1) Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und 2) high resolution Clear-Native-Gelelektrophorese (hrCNE-PAGE). In der zweiten Dimension wurden die herausgetrennten Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten durch Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt.

#### 4.1.2.1. Elektrophorese

Bei der Elektrophorese werden geladene Teilchen in einem elektrischen Feld bewegt. Die Bewegungsgeschwindigkeit von Makromolekülen hängt dabei vom elektrischen Feld und der elektrophoretischen Mobilität der Teilchen ab. Befindet sich ein Teilchen mit der Ladung  $q$  in einem elektrischen Feld  $E$ , so wirkt auf das Teilchen die beschleunigende Kraft  $F_e$  mit

$$F_e = q \times E$$

Wenn sich das Teilchen in einem Medium befindet, so wirkt darauf zusätzlich eine Reibungskraft ( $F_R$ ). Die Kraft für kugelförmige Teilchen in einer Flüssigkeit wird durch das Stokes'sche Gesetz beschrieben:

$$F_R = 6\eta \times v \times r \times \pi$$

mit  $\eta$  = Viskosität der Flüssigkeit

$v$  = Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens

$r$  = Radius des Teilchens

Im Kräftegleichgewicht  $F_e = F_R$  bewegt sich ein Teilchen mit einer Ladung  $q$  mit konstanter Bewegungsgeschwindigkeit von:

$$v = q \times E / 6\eta \times r \times \pi$$

Die Bewegungsgeschwindigkeit ist proportional zur Ladung des Teilchens und der elektrischen Feldstärke, aber umgekehrt proportional zu seiner Größe (Radius  $r$ ) und der

Viskosität des Mediums. Dieses System hängt aber auch noch von weiteren Größen wie die Nettoladung bei einem bestimmten pH-Wert, Größe und Form der Teilchen, Temperatur und der elektrische Widerstand ab.

Die Nettoladung eines Proteins in wässriger Lösung ist abhängig vom pH-Wert der Lösung und dem isoelektrischen Punkt des Proteins, der sich aus der Anzahl und dem pKa-Wert von geladenen Aminosäureseitengruppen ergibt. Native Proteine würden deshalb je nach Art und Größe ihrer Nettoladung entweder zur positiven oder negativen Elektrode wandern.

In den meisten Fällen wird die Elektrophorese von Proteinen heute in stabilisierenden Medien durchgeführt. Bei der Gelelektrophorese erfolgt die Trennung in einem Gel, das durch einen Molekularsiebeffekt die Mobilität selektiv herabsenken kann. Kleine Moleküle wandern z.B. am schnellsten in Richtung der Anode (s. Abbildung 39).

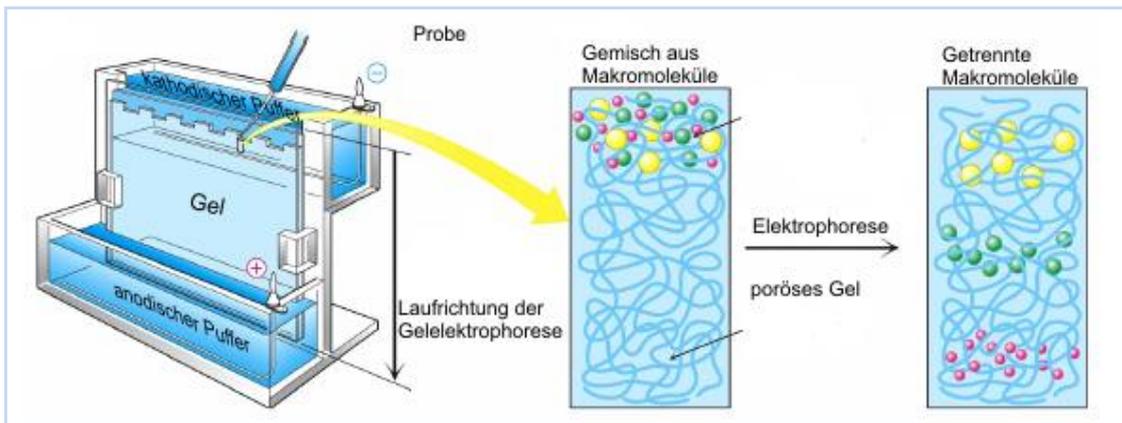


Abbildung 39. Trennung von Makromolekülen in einer Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur. Modifiziert nach (Berg et al., 2003).

Polyacrylamidgele haben sich für Proteine zum wichtigsten Trennmedium bei der analytischen Elektrophorese entwickelt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophoresen werden üblicherweise als PAGE abgekürzt. Solche Gele sind chemisch inert und sehr stabil und bestehen aus einem Polymer von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Dabei dient Bisacrylamid als Quervernetzer und erzeugt mit Acrylamid eine dreidimensionale Gelmatrix.

Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) eingeleitet, das in Sulfatradikale zerfällt. Diese Radikale brechen die Doppelbindungen von Acrylamid auf und leiten damit die Polymerisation ein. Anschließend stabilisiert Tetramethylethylen-

diamin (TEMED) die freien Radikale und wirkt dadurch als Katalysator (s. Abbildungen 40 und 41).

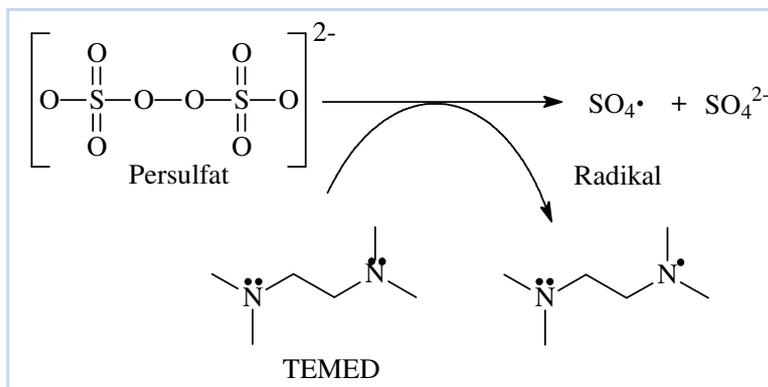


Abbildung 40. Bildung von Sulfatradikalen.

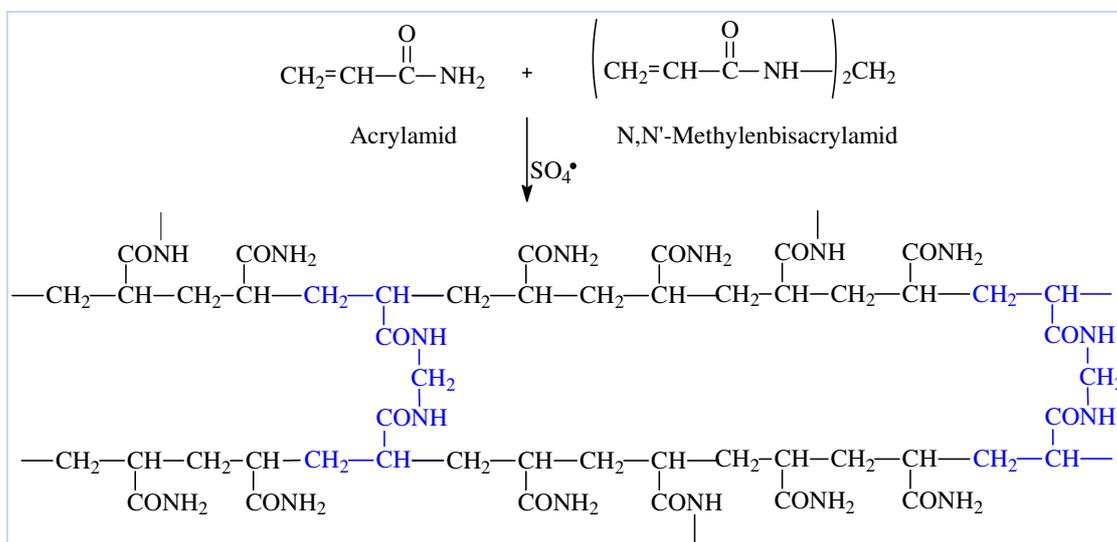


Abbildung 41. Polymerisation von Acrylamid.

Das vernetzte Polymer Polyacrylamid wirkt wie eine Art Molekularsieb: die Proteine werden in einem elektrischen Feld in etwa proportional zu ihrer molekularen Masse bei ihrer Wanderung durch das Gel verlangsamt.

Die Elektrophorese findet oft nur in einem Puffer mit konstantem pH statt (kontinuierliche oder Zonen-Elektrophorese). In manchen Fällen wird auch die diskontinuierliche Elektrophorese eingesetzt bei der mehrere verschiedene Puffer verwendet werden (s. Abbildung 42). Im Sammelgel ist die Mobilität der Proteine ausschließlich durch die Ladung bestimmt. So werden die Proteine in Zonen gleicher Ladung gewissermaßen vorsortiert. Beim Auftreffen auf das engporige Trenngel werden die Proteine retardiert

und es bildet sich ein Proteinstau. Die Mobilität ist dann von der Ladung und der Molekülgröße abhängig.

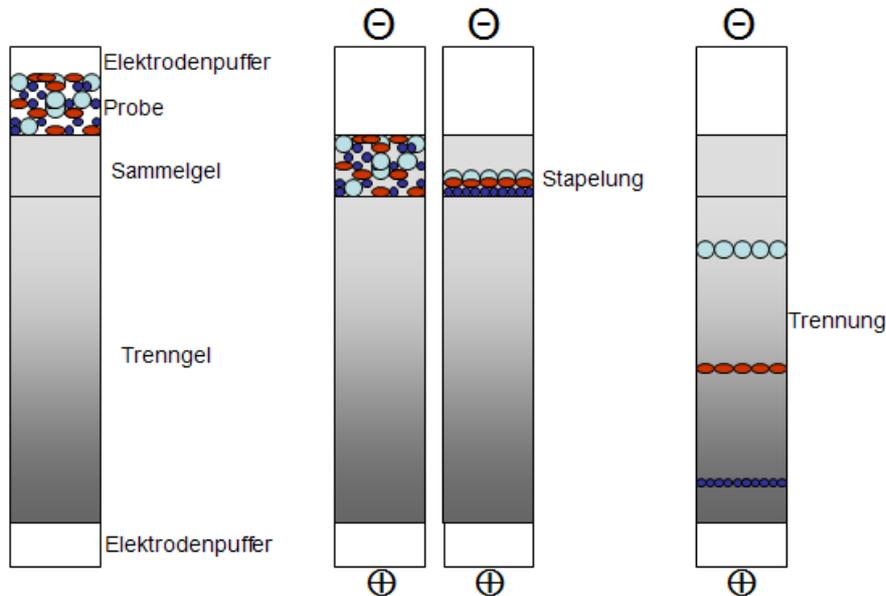
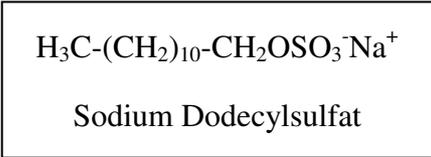


Abbildung 42. Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese.

#### 4.1.2.1.1. SDS-PAGE

Bei SDS werden die Proteine mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (Englisch: Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) versetzt, um einerseits den Einfluss der Eigenladung bei der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen auszuschalten und andererseits die Trennung der Proteine unabhängig vom Ladungszustand zu gestalten. SDS bindet sich an hydrophobe Regionen von Proteinen und bringt über seine anionische Kopfgruppe eine hohe negative Gesamtladung in den SDS-Proteinkomplex. Damit „denaturiert“ SDS die Proteine,



d.h. es zerstört ihre native Konformation (v.a. nach Erwärmung). Dabei werden Wasserstoffbrückenbindungen gespalten und hydrophobe Wechselwirkungen aufgehoben. Außerdem verhindert SDS die Aggregatbildung von Proteinen und führt dazu, dass die denaturierten Polypeptidfäden gestreckt und zu Mizellen geformt werden. Dabei erhalten alle Mizellen eine negative Ladung, die proportional zur Masse ist. Da die Radien dieser Mizellen auch proportional zum Molekulargewicht sind und die eigene Ladung der Proteine überdeckt wird, werden Proteine nicht nach ihrer Ladung sondern nur nach ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die Beweglichkeit dieser SDS-Proteinkomplexe

in einer Gelmatrix hängt im Idealfall nur von ihrer Größe und Form ab und ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Diese Beziehung ermöglicht es, Molekulargewichte von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen zu ermitteln, allerdings als apparente Molekulargewichte, da nicht alle Proteine genau dieser Beziehung folgen.

Da pro Masseneinheit eines Proteins eine konstante Menge an SDS adsorbiert wird (1,4 g SDS/g Protein, d.h. 1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäuren), ist das Verhältnis von Ladung zu Masse in allen SDS-Proteinkomplexen weitgehend gleich.

Die Beweglichkeit der SDS-Proteinkomplexe kann über die Porengröße des Gels kontrolliert werden. Je nach erwartetem Molekulargewicht der Proben werden unterschiedliche Porengrößen des Trenngels ausgewählt. Die Porengröße wird sowohl vom Gesamtgehalt (%T) an Acrylamid und Bisacrylamid (= Quervernetzer) als auch vom Anteil des Quervernetzers am Gesamtgehalt (%C) bestimmt.

#### ***4.1.2.1.2. Native Gelelektrophorese***

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird kein SDS zugesetzt. Aus diesem Grund werden die Proteine nicht denaturiert, d.h. es bleiben die Sekundär-, Tertiär-, und die Quartärstruktur und damit auch die Eigenschaften der Proteine erhalten (z.B. Enzyme). Eine Durchführung von In-Gel Reaktionen (Umsetzung bestimmter Stoffe durch Enzyme „in Gel“) ist daher möglich.

Die Proteinauftrennung in der Gelelektrophorese erfolgt anhand der Eigenladung des Proteins, die durch den pH-Wert des Puffers bestimmt wird. Außer dem pH-Wert hängt die Trennung auch von der Größe, Ladung und Gelmatrix („Netz“, z. B. Polyacrylamidgels) ab.

Bei der nativen Elektrophorese wird oft ein ähnlicher Ansatz wie bei der SDS-Elektrophorese verfolgt, allerdings entweder ohne Zugabe von SDS in der Probenvorbereitung und im Elektrophorese-Puffer oder durch Ersatz von SDS durch mildere, neutrale Detergenzien. Diese Systeme funktionieren gut für wasserlösliche Proteine, aber sind nicht für Membranproteine geeignet, da diese aggregieren oder durch das Detergenz im Gel denaturiert werden.

Als Nachteile der nativen Gelelektrophorese sind zu sehen, dass sie für Membranproteine nicht geeignet ist, und dass durch sie weder das Molekulargewicht noch der isoelektrische Punkt eines Proteins bestimmt werden können.

#### **4.1.2.1.3. BN-PAGE und hrCN-PAGE**

Zwei leistungsstarke native Gelelektrophoresetechniken, die bei der Isolierung von Membranproteinkomplexen zum Ansatz kommen, sind die Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und die High-Resolution-Clear-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (hrCN-PAGE).

Die BN-PAGE wurde von Schägger entwickelt und ist für einen Trennungsbereich von 10kDa zu 10MDa geeignet (Schägger and von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Bei diesem Ansatz werden neutrale milde Detergenzien verwendet, um die Membranproteine zu solubilisieren, (u.a. Taurodeoxycholat, Dodecylmaltosid). Danach wird dem Überstand mit den solubilisierten Membranproteinen Coomassie-blau G250 zugesetzt. Dieser negativ geladene Farbstoff bindet die Oberfläche der Membranproteine, wodurch die Proteinkomplexe negativ geladen werden. Aus der Bindung von einer großen Zahl von anionischen, nicht denaturierenden, hydrophoben Farbstoffmolekülen entstehen die nachfolgend beschriebenen, nützlichen Effekte (Schägger, 2003).

Mit Coomassie-blau gebundene Membranproteine sind wasserlöslich. Daher gibt es keine Notwendigkeit für die Präsenz eines Detergenz im Gel. Hierdurch wird die Gefahr der Denaturierung von Detergenz-empfindlichen Proteinen minimiert. Da kein denaturierendes Detergenz verwendet wird, können die intakten Proteine und Komplexe in einem Gradientengel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Coomassie-Farbstoff-Bindung führt zu Verschiebungen des isoelektrischen Punktes von Proteinen auf negative Werte. Alle Proteine, die diesen Farbstoff binden, auch basische Proteine wie Cytochrome c, wandern unter Beibehaltung ihrer Quartärstruktur und enzymatischer Aktivität bei einem pH-Wert von 7,5 nach Anlegen einer Spannung zur Anode. Die Migration der Proteine im Gradientengel verlangsamt sich mit der Laufrichtung und mit abnehmender Porengröße schrittweise und kommt zum Stillstand, sobald der Grenzwert der Porengröße erreicht ist. Die negativen Ladungen auf der Oberfläche der einzelnen Proteine führen zu einem gegenseitigen Abstoßen der Proteine. Dadurch schützt das Coomassie-blau die Proteinkomplexe gegen Proteinaggregation, da der Farbstoff den

Membranproteinen eine wasserlösliche Eigenschaft verleiht. Da die nativen Proteine als blaue, sichtbare Banden durch das Gel wandern, können spezifische Banden relativ einfach geschnitten werden.

Bei der farblosen nativen PAGE (CN-PAGE für Clear Native-PAGE) werden der gleiche Puffer und die gleichen Elektrophoresebedingungen wie bei BN-PAGE angewendet, allerdings ohne die Verwendung von Coomassie Farbstoffen. Diese Technik kann nur für saure Proteinkomplexe verwendet werden, die bei einem pH-Wert von 7,5 zur Anode wandern. Entscheidende Nachteile hierbei sind die höhere Gefahr einer Aggregation von Membranproteinen und die schlechten Trenneigenschaften. Deswegen wurde diese Technik nur sehr wenig genutzt und hat nur dann einen Vorteil gegenüber BN-PAGE, wenn sehr milde Bedingungen für die Trennung von labilen Proteinkomplexen gewählt werden müssen.

Ein anderer Ansatz der nativen Gelelektrophorese ist die hrCN-PAGE (Wittig et al., 2007a). Besonders geeignet war hrCNE-PAGE für die Untersuchung mitochondrialer ATP-Synthase (Komplex V) und der Komplexe I und II aus menschlichen Zellen, die als Modelle für mitochondriale Erkrankungen genutzt werden. hrCN-PAGE bietet im Vergleich zur blau nativen Elektrophorese allgemeine Vorteile für die In-Gel-Tests katalytischer Aktivität (Wittig et al., 2007b).

Bei hrCN-PAGE wird den Proben der Farbstoff Ponceau S statt Coomassie-blau hinzugefügt. Ponceau S erleichtert den Probenauftrag und die Verfolgung der elektrophoretischen Front. An Stelle von Coomassie-blau wird dem Kathodenpuffer eine Mischung des neutralen Detergenzes Dodecylmaltoside (DDM) mit dem anionischen Detergenz Deoxycholol (DOC) zugesetzt. Die gemischten Mizellen vermitteln so den Membranproteinen eine negative Ladung. Damit bleiben die Membranproteine solubilisiert und ihre Auflösung wird erheblich erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl BN-PAGE als auch hrCN-PAGE zur Isolierung der zu untersuchenden Atmungskettenkomplexe aus dem frontalen Cortex männlicher Sprague-Dawley Ratten verwendet. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte wie bei Schägger beschrieben (Schägger and von Jagow, 1991; Schägger, 2003) mit einigen Modifizierungen.

Die mit dem nichtionischen Detergenz DDM solubilisierten Komplexe wurden gemäß dem Standardprotokoll für Rinderherzmitochondrien mit einem Detergenz/Protein-Verhältnis von 3 g DDM/g Protein geprüft. Da keine Erfahrungen zum Solubilisieren von Mitochondrien aus dem frontalen Cortex von Ratten vorlagen, wurden auch weitere Detergenzen:Protein-Verhältnisse in dieser Reihe getestet (2,5 und 4,5 g/g). Für die erste Dimension wurde ein Gradientengel mit der Acrylamidkonzentration von 4-13% (Vorversuch) und 4-16% (Versuch) verwendet. Eine nachfolgende orthogonale Kombination der BN-PAGE mit einem denaturierenden SDS-Gel als zweite Dimension ermöglichte es, die nativ aufgetrennten Komplexe in deren Untereinheiten zu trennen (Schägger et al., 1994).

## **4.2. Experimenteller Teil**

### ***4.2.1. Tierfütterung und Haltungsbedingungen***

In diesem Versuch wurde die Proteinexpression der Atmungskettenkomplexe nach mehrtägiger Verabreichung von Extrakt EGb 761 in verschiedenen Hirnarealen untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei Gruppen mit jeweils drei Tieren mindestens 10 Tage lang in Macrolon®-Käfigen unter folgenden Bedingungen gehalten: freiem Zugang zu Nahrung und Wasser, 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus, kontrollierte Klimabedingungen (21-22°C Temperatur und 50-60% relative Feuchtigkeit). Nach einer 5-tägigen Washout-Periode und Flavonoid-freier-Diät wurde den Untersuchungsgruppen über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich 300 mg/kg des Extraktes EGb 761 p.o. verabreicht. Dies geschah oral über eine Schlundsonde in Form einer Agarextrakt suspension (0,2% Agar, 10 mL/kg KG). Den Tieren der Kontrollgruppe wurde nur Agar 0,2% 10 mL/kg verabreicht. Beide Gruppen erhielten Futter und Wasser ad libitum über die ganze Fütterungszeit. Vier Stunden nach der letzten Fütterung wurden die Tiere getötet, die Gehirne entnommen und verschiedene Areale, u.a. die frontalen Cortex, präpariert.

### 4.2.2. Homogenisierung und Lagerung der Proben

Die Proben des frontalen Cortex vom Rattenhirn wurden in einer Sucroselösung gelagert, da Sucrose die Dissoziation von Multiproteinkomplexen auf dem Gefrierpunkt verhindert (Schägger, 2003). Die anschließende Aufarbeitung ist in Abbildung 43 veranschaulicht.

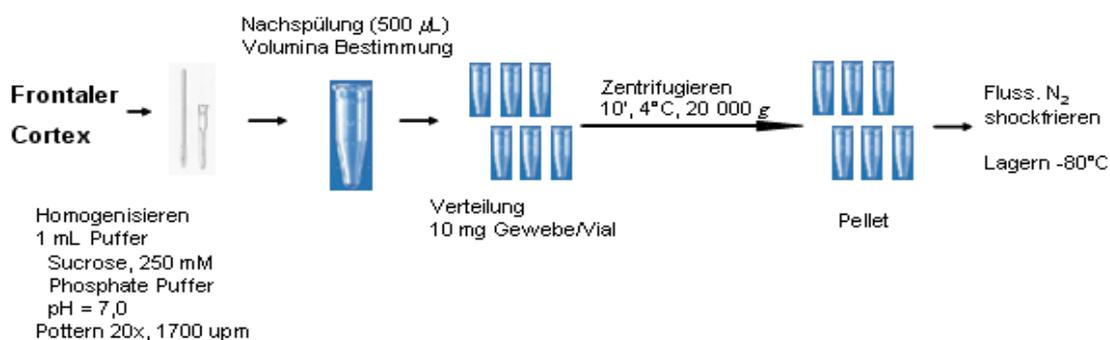


Abbildung 43. Homogenisierung der Proben aus frontalem Cortex von Ratten.

Jede Probe wurde gewogen, mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend mit einem motorgetriebenen Homogenator der Marke „Eurostar“ (IKA Werke GmbH) 20 Mal bei 2.000 upm in 1 mL Sucrosepuffer (250mM Sucrose, 20mM Natriumphosphat, pH = 7,0) in einem Glas/Teflonpotter homogenisiert. Die Homogenate wurden in einen Eppendorfcup überführt und der Glas/Teflonpotter mit 500 mL Puffer nachgespült. Danach wurde das Volumen bestimmt, die Homogenate in Portionen zu je 10 mg Gewebe/Eppendorfvial eingeteilt (s. Tabelle 14) und bei 4°C und 20.000 upm in einer Eppizentrifuge Biofuge Primo R Heraeus zentrifugiert. Die erzeugten Pellets wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Tabelle 14. Gewichtskontrolle des frontalen Cortexes.

Probe	Ginkgo			Kontrolle		
	G1	G2	G3	K1	K2	K3
mg	223,8	222,1	212,0	223,7	217,3	170,6
µl	1356	1452	1468	1440	1464	1430
µl/10mg	60,6	65,4	69,2	64,4	67,4	83,8

### 4.2.3. Solubilisierung der Proben

Die Proteinkomplexe aus der mitochondrialen Membran mussten zunächst mit nicht-ionischen Detergenzien solubilisiert werden. Die Wahl erfolgt nach mehreren, nachfolgend diskutierten Kriterien.

Drei der üblicherweise verwendeten Detergenzien sind Digitonin, DDM und Triton-X-100. Digitonin ist eines der milden Detergenzien. Es bewahrt supramolekulare Verbindungen von Multiproteinkomplexen (Atmungskettensuperkomplexe, oligomere ATP Synthase) und ist für die Ermittlung von physiologischen Protein-Protein-Wechselwirkungen geeignet. Dagegen hat DDM stärkere delipidierende Eigenschaften und ist für die Isolierung von Membranproteinen und einzelner Komplexe geeignet. Triton X-100 wiederum zeigt ein intermediäres Verhalten: Während bei niedrigen Detergenzkonzentrationen von bis zu 1,5 g/g supramolekulare Strukturen entstehen, werden bei hohen Detergenzkonzentrationen von 2-3 g/g, wie beim DDM, Membranproteinkomplexe solubilisiert. Die benötigte Menge und Konzentration an Detergenzien muss bei unterschiedlichen Proben immer angepasst werden (s. Tabelle 15).

Tabelle 15. Benötigte Detergenzmengen für die Solubilisierung von Membranen (Wittig et al., 2006).

	Hefemitochondrie	Säugetiermitochondrie	Bakterielle Membrane
Digitonin 20%	1,0 g/g	2,5 g/g	1,0 g/g
DDM 20%	2,4 g/g	3,0 g/g	2,0 g/g
Triton X-100 20%	3,0 g/g	6,0 g/g	4,0 g/g

Für die Solubilisierung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe aus dem frontalen Cortex von Ratten wurde das DDM gewählt. Allerdings wurde zusätzlich zum Standardprotokoll (1x) jeweils eine niedrigere (0,75x) und eine höhere (1,5x) Konzentration getestet, da es für die Solubilisierung dieser Mitochondrien keine Erfahrungswerte gab (s. Tabelle 16).

Tabelle 16. Design für die Untersuchung der benötigten Detergenzmenge.

Detergenzkonzentration	BNE	hrCNE
0,75x	7,5 µL DDM 20%	7,5 µL DDM 20%
1x (Standardprotokoll)	10 µL DDM 20%	10 µL DDM 20%
1,5x	15 µL DDM 20%	15 µL DDM 20%

Für die Vorbereitung auf BN-PAGE und hrCN-PAGE wurden in Aliquot gelagerte, homogenisierte Proben verwendet, deren Aufarbeitung in Abbildung 44 veranschaulicht ist.

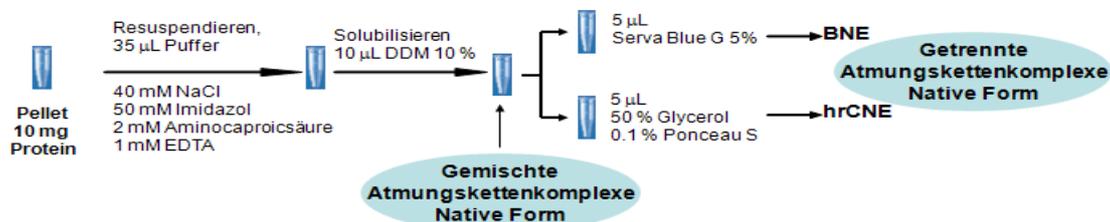


Abbildung 44. Probenaufarbeitung für native Gelelektrophorese.

Das Homogenat wurde zuerst mit 35 µL Resuspensionslösung (40 mM NaCl/ 50 mM Imidazol/ 2 mM Aminocapronsäure, 1 mM EDTA) resuspendiert und dann mit 10 µL DDM 20% schnell solubilisiert. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 100.000 × g und 4 °C zentrifugiert.

Nach der Solubilisierung der Proben wurde der Überstand entweder mit 5µl 5% Serva Blue G/500 mM Aminocapronsäure (für BN-PAGE) oder mit 5µl 0,1% Ponceau S/ 50% Glycerol (für hrCN-PAGE) versetzt.

#### 4.2.4. Durchführung der nativen Gelelektrophorese

Die Herstellung von nativen Gelen werden in Abschnitt 7.2.3 (Tabellen 19 und 20) erläutert und die Bedingungen für die Durchführung der beiden Elektrophorese-Ansätze BN-PAGE und hrCN-PAGE in Abbildungen 46 und 46 veranschaulicht. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C. Das native Gel wurde zunächst in einer vertikalen Elektrophoresekammer ange-spannt. Dann wurde, je nach Ansatz, die obere und untere Pufferkammer mit Kathoden- bzw. Anodenpuffer gefüllt, so dass der obere und untere Gelrand mit

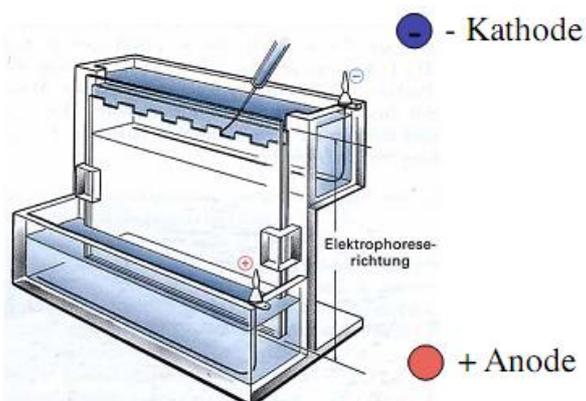


Abbildung 45. Zusammensetzung einer vertikalen Elektrophoresekammer.

Puffer überschichtet war. Der Anodenpuffer war bei beiden Ansätzen gleich. Der Kathodenpuffer enthielt jedoch Serva Blue G bei BN-PAGE und DDM/DOC bei hrCNE.

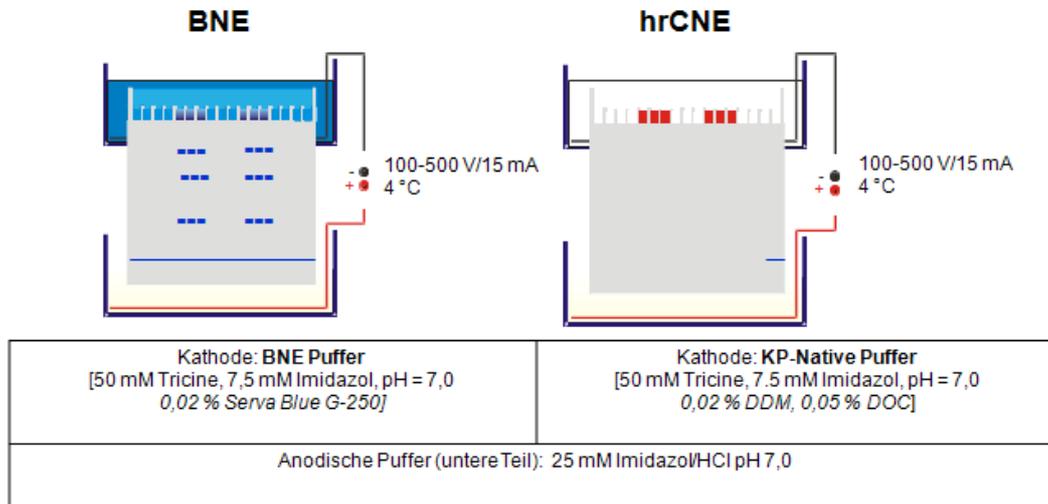


Abbildung 46. Aufbau und Durchführungsbedingungen von BN/ hrCN-Gelelektrophoresen.

Im nächsten Schritt wurden 10 µL der Proteinproben auf die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese begann bei 100 V, bis alle Proben in dem Sammelgel eingetreten waren. Anschließend wurde die Spannung auf 500 V erhöht und der Strom auf 15 mA/Gel begrenzt. Nach einem Drittel der gesamten Gelstrecke, wurde der BNE-Kathodenpuffer durch einen 1:10 verdünnten Kathodenpuffer ersetzt. Dieser optionale Pufferaustausch verbesserte die Erkennung von schwachen Banden. Die Elektrophorese wurde nach 3-4 Stunden beendet. Die Gelfront war zu diesem Zeitpunkt noch nicht in den Anodenpuffer gewandert.

Zum Schluss wurden die Gele mit Coomassie-blau gefärbt (s. Abschnitt 4.2.6.1. Coomassie-blau-Färbung) und die Größe der Proteinkomplexe durch den direkten Vergleich mit einem Standard aus Rinderherzmitochondrien (Bovine Heart Mitochondria, BHM) abgeschätzt (Schägger, 2003).

#### 4.2.5. SDS-PAGE

Die Auftrennung der Untereinheiten der Membranproteinkomplexe nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger (2006). Im Vorversuch wurden Trenngele von 10% Acrylamid/Bisacrylamid verwendet. Für die Ginkgo- und Kontrollproben wurden jeweils 16%-ige Trenngele verwendet.

#### **4.2.5.1. Vorbereitung von SDS-Gelen**

Nach erfolgtem Lauf in der ersten Dimension wurde das Gel in Streifen geschnitten, mit SDS 1% eingefeuchtet und auf einer Glasplatte angesetzt. Der Rest von SDS wurde mit einem Filterpapier entfernt und dann die Gelstreifen zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,7 mm fixiert. Die Acrylamidlösung der zweiten Dimension (s. Tabelle 21 in Abschnitt 7.2.2 für die Herstellung) wurde manuell bis etwa 0,3 cm unterhalb der Gelstreifen eingefüllt. Die Lücke zwischen der Acrylamidlösung und dem Gelstreifen wurde mit Wasser gefüllt.

Nach erfolgter Polymerisation der zweiten Dimension bei Raumtemperatur wurden die Gelstreifen vorsichtig auf das Gel der zweiten Dimension geschoben und das Wasser entfernt. Anschließend wurde in die Lücken zwischen dem Gel der ersten Dimension und den seitlichen Rändern eine Acrylamid-Lösung für Nativ-Gele (s. Tabelle 22 in Abschnitt 7.2.3 für Herstellung) bei Raumtemperatur einpolymerisiert.

#### **4.2.5.2. SDS-PAGE Durchführung**

Die SDS-Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur. Zunächst wurde das SDS-Gel in einer vertikalen Elektrophoresekammer angespannt. Dann wurden der SDS-Kathodenpuffer (0,1 M Tris / 0,1 M Tricine / 0,1% SDS, pH 8,25) und SDS-Anodenpuffer (0,1 M Tris, pH = 8,9) in den oberen und unteren Teil des Systems gegossen. Die Elektrophorese begann bei 100 V. Nachdem die Proben in das Sammelgel eingetreten waren, wurde die Spannung auf 190 V erhöht und der Strom auf 80 mA/Gel begrenzt. Der Strom wurde ausgeschaltet bevor die Elektrophoresefront das Gel verlies.

#### **4.2.6. Identifizierung und Quantifizierung**

Nach der Durchführung der Elektrophorese wurden die Proteinbanden unter Verwendung der Coomassie-blau-Färbung und der Silberfärbung identifiziert.

##### **4.2.6.1. Coomassie-blau-Färbung**

Bei dieser Methode bindet sich Coomassie-blau unspezifisch an die kationische und hydrophoben Seitenketten des Proteins. Dabei beträgt die Nachweisgrenze 50-100 ng. Der Nachteil der Coomassie-Färbung ist jedoch ihre geringe Empfindlichkeit.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden zuerst 30-60 min lang in 10% Essigsäure und 50% Methanol fixiert und danach 30-60 min lang in einer Farblösung geschüttelt, die aus 10% Essigsäure und 0,025% Serva Blau G bestand. Anschließend wurden die Gele mindestens 30 min lang mit 10% Essigsäure entfärbt. Dadurch wurden sie wieder transparent und nur die Proteinbanden blieben blau und dadurch sichtbar.

#### 4.2.6.2. Silberfärbung

Bei dieser Art von Färbung bilden  $Ag^+$ -Ionen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten. Durch die Reduktion mit Formaldehyd in alkalischer Lösung entsteht elementares Silber. Dies führt zu einer rotbraunen bis schwarzen Färbung und macht die Proteine sichtbar. Im Vergleich zur Coomassie-blau-Färbung ist die Empfindlichkeit bei Silberfärbung höher und die Nachweisgrenze liegt im unteren Nanogrammbereich. Der Nachteil dieser Färbemethode ist, dass sie zur Quantifizierung von Proteinen nicht geeignet ist, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität eingefärbt werden. Bei der Silberfärbung werden außerdem Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide und Glykolipide eingefärbt, da Silberionen unspezifische Wechselwirkungen eingehen.

Für die Silberfärbung wurden die Gele aus der Coomassie-Färbung zunächst in 50% Methanol entfärbt und dann das nach in Tabelle 17 aufgeführte Silberfärbungsprotokoll ausgeführt.

Tabelle 17. Silberfärbungsprotokoll .

Schritt	Reagenzien	Zeit
Fixierung	50 % Methanol, 10% Essigsäure	30 min
Abspülung	Wasser, zwei Mal	30 min
Sensitisierung	0,005 % $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	30 min
Silber-Reaktion	0,1% $AgNO_3$	30 min
Abspülung	Wasser, nur Oberflächen kurz spülen	Sekunden
Entwicklung	0,036% Formaldehyd, 2% $Na_2CO_3$	1-2 min
Reaktionstopp	50 mM EDTA	15 min
Abspülung	MilliQ-Wasser	-

#### ***4.2.7. Katalytische Aktivität In-Gel***

Die Grundlage für die Geltests in dieser Arbeit sind von Zerbetto et al. (1997) beschrieben worden. Nachfolgend wird berichtet, wie die Komplexe I und II in den Gelen nach Wittig et al. (2007b) analysiert wurden. Alle Tests wurden bei 20-25°C durchgeführt.

Für die Aktivität von Komplex I wurden die ganzen Gele aus der hrCN-PAGE mit ca. 40 mL vom Testpuffer in einer Kiste überdeckt und geschüttelt. Der Testpuffer enthielt 3 mM (2,5 mg/mL) blaues Nitrotetrazolium (NTB) in 5 mM Tris/HCl pH 7,4. Diesem wurde 120 µL von 50 mM NADH Stocklösung mit einer Endkonzentration von 150 µM (0,1 mg/mL) NADH zugesetzt. Die Reaktion wurde nach ca. 3-5 Minuten mit der Fixierungslösung (50% Methanol/10% Essigsäure) abgebrochen.

Wie bei der Aktivität der Komplexe I wurden bei der Komplex II-Aktivität die ganzen Gele aus der hrCN-PAGE mit ca. 40 mL vom Testpuffer in einer Kiste überdeckt und geschüttelt. Der Komplex II-Assay-Puffer enthielt 3 mM (2,5 mg/mL) NTB in 5 mM Tris/HCl pH 7,4, welches mit 0,8 mL von 1 mM Natriumsuccinat Stocklösung (Endkonzentration 25 mM) und 32 µL von 250 mM Phenazin-Methosulfat-Stocklösung (Endkonzentration 20 mM) versetzt wurde. Die Inkubationszeit betrug 10-30 Minuten, dann wurde die Reaktion mit der Fixierungslösung gestoppt. Anschließend wurden die Gele optisch analysiert und für die densitometrische Quantifizierung gescannt.

Nach der Coomassie-Färbung oder den katalytischen Tests erfolgte die Quantifizierung durch Densitometrie unter Verwendung des BioRad ChemiDoc XRS-Systems.

### 4.3. Ergebnisse

Zunächst musste ein Vorversuch zur Optimierung der Elektrophoresebedingungen durchgeführt werden. Mit den dort erhobenen Daten konnte anschließend der eigentliche Ginkgoversuch durchgeführt werden.

#### 4.3.1. Vorversuch

Im Vorversuch wurde die Detergenzkonzentration für die Solubilisierung der Membranproteine geprüft. Die geprüften Konzentrationen entsprachen 0,75x, 1x, und 1,5x der Standardkonzentration von 3 g DDM/g Protein. Dies wurde sowohl bei BN-PAGE als auch bei hrCN-PAGE untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 veranschaulicht.

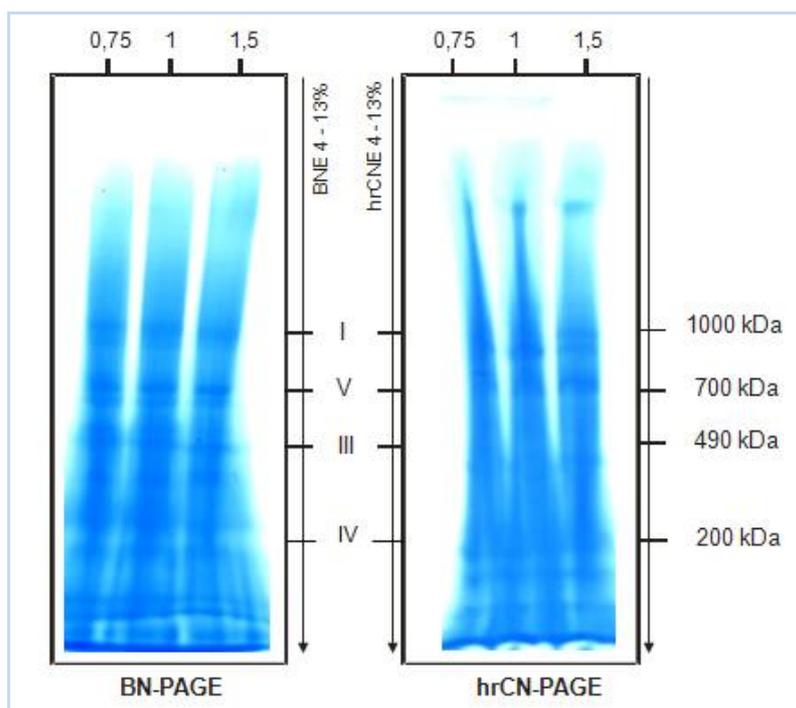


Abbildung 47. BN-PAGE und hrCN-PAGE von mitochondrialen Atmungskettenkomplexen von Rattenhirn. Die Detergenzkonzentrationen entsprachen 0,75x, 1x und 1,5x der Konzentration im Standardprotokoll (3 g DDM/g Protein).

Beide native Ansätze zur Gelelektrophorese erwiesen sich für die Trennung der Komplexe I, III, IV und V aus den Proben als geeignet. Die optimalen Bedingungen für die Auflösung von Mitochondrien aus dem frontalen Cortex entsprachen dabei denen des

Standardprotokolls. Aus diesem Grund wurde für die Ginkgoversuche nur noch die Detergenzkonzentration von 3 g/g Protein verwendet.

Die zweidimensionale Auftrennung der Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe ist in Abbildung 48 veranschaulicht. Bei beiden nativen Elektrophoresevarianten wurden die Untereinheiten der Komplexe I, III, IV und V aufgetrennt. Da die Untereinheiten von Komplex II nicht deutlich zu erkennen waren, wurden bei dem Ginkgoversuch 16%-ige SDS-Gele zur besseren Trennung verwendet.

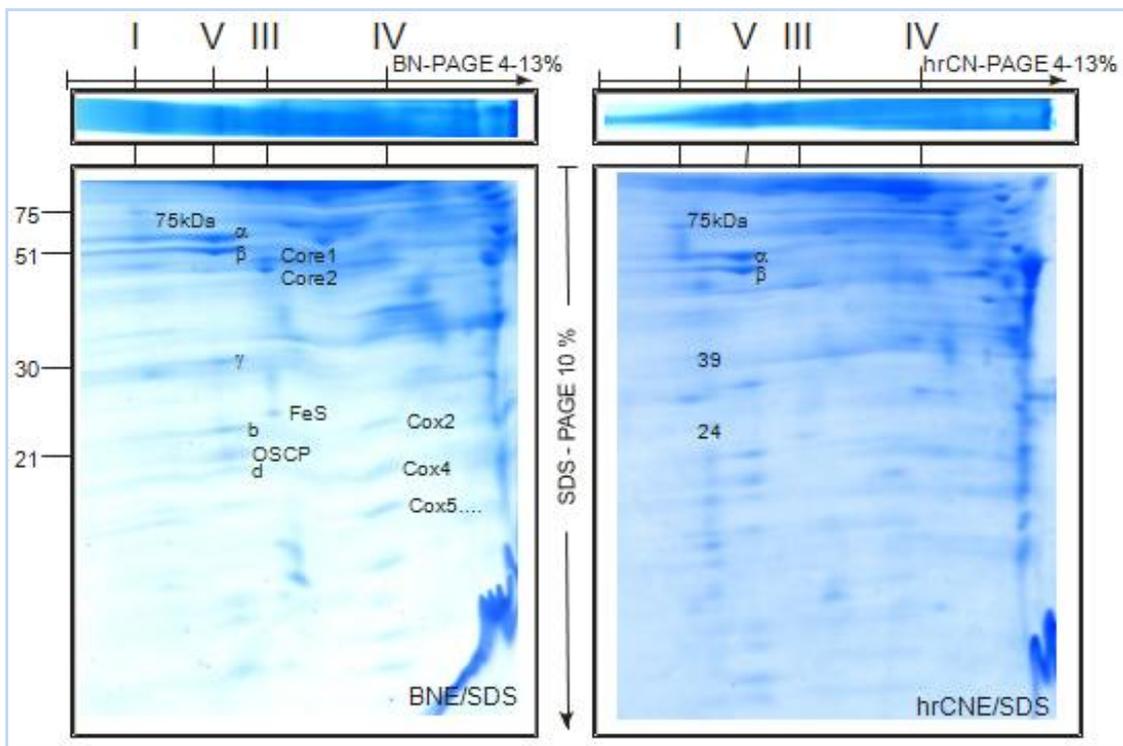


Abbildung 48. Auftrennung der Untereinheiten von mitochondrialen Atmungskettenkomplexen mit BN- bzw. hrCN-PAGE 4-13% für die erste Dimension und SDS-Gel 10% für die zweite Dimension.

In der qualitativen Analyse der Gele konnten einerseits beobachtet werden, dass die In-Gel-Aktivitäten der Komplexe I und II in hrCN-PAGE eindeutiger als die gefärbten Proteinbanden im Gel waren, und andererseits, dass sich BN-PAGE besser für die Auftrennung der Komplexe III, IV und V als hrCN-PAGE eignete.

### 4.3.2. Ginkgoversuche

Mit den optimierten Bedingungen aus dem Vorversuch wurden die Proben aus dem frontalen Cortex von Kontrolltieren im Vergleich zu denen mit 300 mg/kg KG von EGb 761 gefütterten Ratten untersucht.

Der erste Schritt bestand darin, eine gute Methode für die Quantifizierung der Untereinheiten zu etablieren. Es gab zwei Möglichkeiten, die für diesen Zweck in Frage kamen 1) die Quantifizierung durch die Aktivität im Gel von Komplex I und II und 2) die Quantifizierung durch Densitometrie von Coomassie-gefärbten Proteinen.

Zuerst wurde die Linearität der In-Gel Aktivität von Komplex I und II geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 zusammengefasst. Die Abbildung zeigt die Banden entsprechend Komplex I, nachdem die Aktivität in Gel getestet wurde. In Tabelle 18 sind die gemessenen Mengen von Kontroll- und Ginkgoproben zusammengefasst.

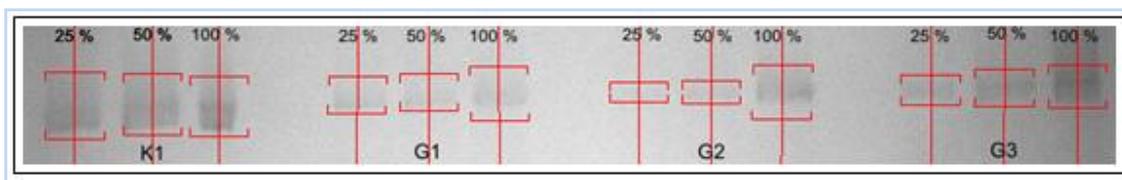


Abbildung 49. In-Gel Aktivität von Komplex I in frontaler Cortex von Kontroll- und Versuchstieren (K1 bzw. G1, G2 und G3), die mit 300 mg/kg KG EGb 761 über 28 Tage gefüttert wurden. Die Prozentwerte entsprechen der relativen Konzentration von Komplex I.

Tabelle 18. Relative gemessene Konzentrationen bei der In-Gel-Aktivität von Komplex I.

Ladung	Kontrolle 1	Ginkgo 1	Ginkgo 2	Ginkgo 3
25%	43,3	6,3	36,6	74,5
50%	44,1	16,4	84,3	112,2
100%	100,0	100,0	100,0	100,0

Diese Ergebnisse zeigten keine lineare Korrelation zwischen der Menge an Proteinenladung und der Aktivität in den Gelen. Daher war eine Quantifizierung durch diese Methode nicht möglich. Die In-Gel-Aktivität von Komplex II ergab die gleichen Ergebnisse, wobei die Banden noch diffuser waren und eine Auswertung erschwerten.

Die zweite Möglichkeit für die Quantifizierung war die Densitometrie. Bei dieser Methode wird die Farbdichte, d.h. die Farbmenge pro Flächeneinheit quantitativ gemessen. Die Densitometrie basiert auf der Linearität zwischen Farbmenge und optischer Dichte, d.h. je mehr Farbe vorhanden ist, desto weniger Licht wird reflektiert oder transmittiert.

Aus diesem Grund und weil die In-Gel-Aktivität keine linearen Ergebnisse erbrachte, wurde die Densitometrie für die Quantifizierung der Untereinheiten verwendet.

Die Untereinheiten, die aufgrund ihrer besseren Trennung und Auflösung für die Quantifizierung gewählt wurden, sind in Abbildung 50 veranschaulicht.

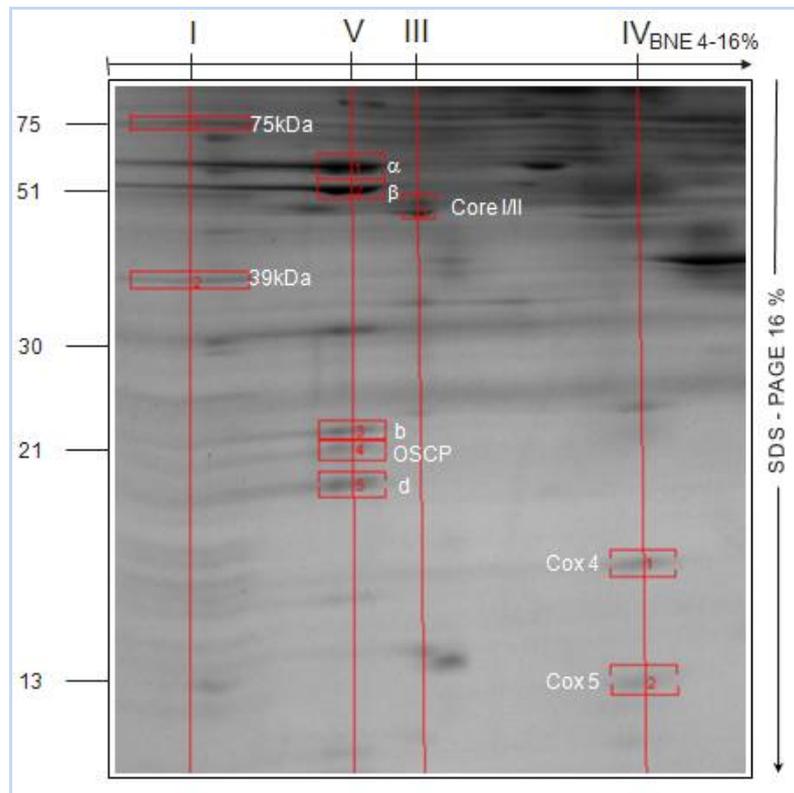


Abbildung 50. Aufgetrennte Untereinheiten von Komplex I, III, IV und V, die bei densitometrischer Quantifizierung verwendet wurden.

Im letzten Schritt wurden die zweidimensionalen Gele der Versuchstiere mit den Gelen der Kontrolltiere verglichen und als relative Prozentwerte dargestellt (s. Abbildung 51).

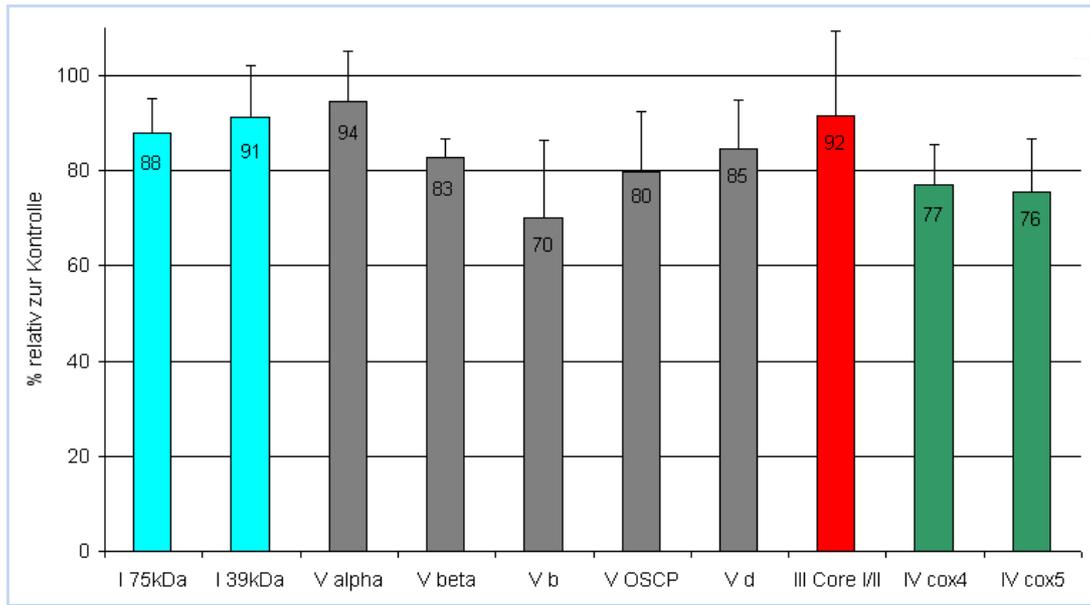


Abbildung 51. Quantifizierung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe Untereinheiten aus dem frontalen Cortex von Ratten, gefüttert mit 300 mg/kg EGb 761 über 28 Tage.

Diese Ergebnisse zeigten eine allgemeine Verminderung der einzelnen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe nach über 28-tägiger Gabe von EGb 761 mg/kg. Die Ergebnisse zeigen nur für die Untereinheiten vom Komplex IV und V einen deutlichen Unterschied zu den Kontrolltieren, nicht aber für Komplex I und II.

Aus diesen Ergebnissen kann kein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Versuchstieren gefolgert werden. Aus diesem Grund kann die Korrelation zwischen der Menge von Atmungskettenkomplexen und die möglichen Wirkungen von EGb 761 nicht ermittelt werden.

Da die o.g. Studie wurden nur mit wenigen Tieren durchgeführt (Pilotstudie, n=3). Weitere Untersuchungen mit mehreren Tieren (n=5) bzw. mit anderen Gehirnnareale könnten möglicherweise durchgeführt werden, um die Rolle von EGb 761 in den Atmungskettenkomplexen zweifelsfrei besser zu verstehen.

## 5. DISKUSSION

Für Trockenextraktpräparate aus Ginkgo konnte die klinische Wirksamkeit im Frühstadium von Morbus Alzheimer zweifelsfrei nachgewiesen werden. Für den Spezialextrakt EGb 761 liegt dabei die höchste Dichte an Placebo-kontrollierten Studien vor, während für andere Extrakte, wie z.B. LI 1370, deutlich weniger Erkenntnismaterial vorliegt. Daneben gibt es auf dem Markt noch zahllose andere Produkte, zum Teil unklarer Herkunft, die häufig nicht den Kriterien entsprechen, welche in der Monographie der Kommission E festgelegt wurden. Diese Produkte werden in der folgenden Diskussion deshalb nicht betrachtet.

Bei Morbus Alzheimer handelt es sich zweifellos um eine multifaktorielle Erkrankung mit einer ganzen Reihe möglicher Ursachen. So spielt eine genetische Disposition, besonders beim frühen Ausbruch (early-onset) der Krankheit eine nicht zu unterschätzende Rolle. Andererseits ist der größte Risikofaktor für die Entwicklung von Alzheimer mit Sicherheit das Altern.

In den vergangenen 25 Jahren wurden zunehmend neue Ursachen für Alzheimer vorgeschlagen, wie z.B. Verlust cholinergener Neurone, Neuroinflammation, Apoptose, exzessive Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, Cholesterin und Amyloidablagerungen. Jede dieser Ursachen ist ein potentieller Angriffspunkt für eine Alzheimertherapie. Einige Wirkstoffe konnten bereits erfolgreich in die Therapie eingeführt werden, wie die Cholinesterase-Hemmstoffe oder die NMDA-Rezeptorantagonisten, andere Behandlungsstrategien befinden sich noch im Versuchsstadium.

Zusätzlich zu den o.g. Ursachen legt eine Reihe von Untersuchungen die Vermutung nahe, dass oxydativer Stress ein Schlüsselfaktor in der Entstehung und Progression einer Alzheimer Demenz sein könnte. Neben den chemisch-synthetischen Wirkstoffen ist der Ginkgospezialextrakt EGb 761 die einzige pflanzliche Alternative mit Wirksamkeitsnachweis bei der Behandlung von Morbus Alzheimer.

Obwohl Ginkgo zu den am besten untersuchten Arzneipflanzen zählt, konnten seine molekularen Wirkmechanismen bis heute nicht im Detail beschrieben werden. Die bisher bekannten Daten legen den Schluss nahe, dass EGb 761 eine vielschichtige Wirkweise besitzt. So beeinflusst EGb 761 den  $\beta$ -Amyloid-Peptid-Stoffwechsel positiv,

wirkt procholinerger, senkt den Cholesterinspiegel, besitzt eine antientzündliche Wirkkomponente und ist ein effektives Antioxidant. Diese Vielzahl an Wirkungen und Effekten wird im Wesentlichen zwei Substanzklassen, den Terpenlaktonen sowie den Flavonoiden, zugeschrieben. Grundlegende Voraussetzung für eine Beteiligung an der Wirkung des Extraktes ist jedoch, dass diese Substanzen nach oraler Gabe in den systemischen Kreislauf aufgenommen werden, oder in der Lage sind, die Blut-Hirnschranke zu überwinden.

Die Datenlage zur Bioverfügbarkeit der Ginkgoinhaltsstoffe ist vergleichsweise dünn. Hinsichtlich der Terpenoide sind nur drei Pharmakokinetikstudien an Tieren (Biber and Koch, 1999) und humanen Probanden (Fourtillan et al., 1995; Biber, 2003) durchgeführt worden. Bezüglich der Ginkgoflavonoide liegt eine Pilotstudie vor, bei der lediglich der Gesamtflavonoidgehalt im Plasma nach der oralen Verabreichung des Extrakts LI 1370 bestimmt wurde (Nieder, 1991). Daneben existiert eine weitere Studie, in der die Bioäquivalenz von drei unterschiedlichen Ginkgo-Arzneiformen nach oraler Gabe hinsichtlich der Flavonoidaglyka untersucht wurde (Wojcicki et al., 1995). Tatsache ist aber, dass die Bioverfügbarkeit der wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffe von Ginkgo noch nicht umfassend untersucht wurde und dass bisher die Nachweise der Bioverfügbarkeit im ZNS weder für die Ginkgolide bzw. das Bilobalid noch für die Flavonoidglykoside erbracht werden konnten.

Diese Arbeit ist die erste, die ein detailliertes Bild der Pharmakokinetik der Ginkgoflavonoide darlegt. Bei den Untersuchungen wurde dem Umstand Rechnung getragen, dass die Flavonoide nach oraler Gabe bereits im Gastrointestinaltrakt einer Degradation unterliegen und nach Aufnahme in den systemischen Kreislauf eine umfassende Metabolisierung der Substanzen erfolgt. Als Analyte wurden deshalb die gemeinsamen Aglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin der Ginkgoflavonoide gewählt, die einfach durch saure Hydrolyse bei 90°C aus den Plasma- und ZNS-Proben erhalten wurden. Damit wird das gesamte Spektrum der in dem Extrakt vorkommenden Flavonoide wie auch aller Metaboliten abgedeckt.

Die Ergebnisse des ersten Tierversuchs (Einmalgabe von 600 mg Extrakt pro kg Körpergewicht) zeigten klar, dass die Flavonoide im systemischen Kreislauf verfügbar sind. Der höchste Plasmaspiegel wurde dabei für das Aglykon Kämpferol (ca. 350 ng/mL)

gemessen, gefolgt von Quercetin und Isorhamnetin/Tamarixetin mit jeweils ca. 170 ng/mL.

Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass Flavonoide ubiquitär in der Natur vorkommen, und daher die Tiere über die natürliche Nahrung entsprechende Mengen Flavonoide aufnehmen. Deshalb ist es nicht weiter verwunderlich, dass im Plasma von Ratten, die keinen Extrakt erhalten hatten, dafür aber mit natürlichem Futter gefüttert wurden, ein ebenso hoher Quercetinspiegel bestimmt werden konnte (Paulke et al., 2008). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Hollman und Katan (1997) gemacht.

Bei der Betrachtung der Konzentrations-Zeit-Kurve fällt jedoch auch sofort auf, dass 24h nach Gabe des Extraktes noch ungewöhnlich hohe Konzentrationen im Blut zu finden sind. Eine wiederholte Extraktgabe, einmal täglich über 8 Tage, führte dann zu einer beträchtlichen Zunahme der Plasmaspiegel aller Flavonoidmetabolite. Für Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin wurde eine Erhöhung der Plasmakonzentration in diesem kurzen Zeitraum um mehr als den Faktor 10 beobachtet. Weniger stark ausgeprägt war dieser Effekt für Quercetin.

In Summe kann aber festgehalten werden, dass nach einer wiederholten Gabe des Ginkgoextraktes EGb 761 deutlich höhere Plasmaspiegel erreicht werden können, wie die, die durch natürliche Ernährung hervorgerufen werden. Selbst bei Reduktion der Tagesdosis von 600 mg/kg Körpergewicht auf 100 mg/kg KG wurden deutlich höhere Plasmawerte gemessen, wie in der unbehandelten Gruppe. Hieraus folgt, dass eine kontinuierliche Extraktgabe über einen längeren Zeitraum, wie dies bei der Behandlung von Morbus Alzheimer mit Ginkgo Extrakten der Fall ist, eine notwendige Voraussetzung zu sein scheint, um ausreichende Wirkspiegel an Flavonoiden zu erhalten.

Höchst interessante Ergebnisse erbrachten die Untersuchungen vom Gehirn. Erstmals konnten Ginkgo Flavonoide bzw. deren Metaboliten im ZNS von Tieren nach oraler Gabe eines standardisierten Ginkgoextraktes nachgewiesen werden. Wie auch bei den Plasmauntersuchungen, so konnte auch hier eine signifikante Zunahme der Flavonoidkonzentrationen im ZNS mit Dauer der Extraktgabe beobachtet werden. Wenngleich an dieser Stelle angemerkt werden muss, dass selbst nach mehrtägiger Gabe (8 Tage) keine Quercetinmetaboliten im ZNS nachgewiesen werden konnten. Dieser Umstand ist zum

Teil sicher auch durch die etwas geringere Empfindlichkeit der analytischen Methode für Quercetin zu erklären.

Bemerkenswert war auch, dass die Zunahme der Flavonoidkonzentration im ZNS über die Zeit nicht so ausgeprägt war wie im Plasma. Lag zwischen dem 1.Tag und 8.Tag im Plasma bei der Kämpferol- und Isorhamnetin/Tamarixetin-Konzentration noch der Faktor 10, so war im ZNS nur etwas mehr als eine Verdopplung der Konzentration messbar. Einschränkend muss an dieser Stelle jedoch angemerkt werden, dass die Dosis von 600 mg/kg nicht mit den therapeutischen Dosen am Menschen vergleichbar waren. Aufgrund dieses Umstandes und der Tatsache, dass die Konzentrationen im ZNS nach Verabreichung von 600 mg/kg Extrakt über 8 Tage vergleichsweise hoch waren, wurde der Versuch mit einer niedrigeren Dosis von 100 mg/kg wiederholt.

Gleichzeitig sollte diese Studie Aufschluss über die Verteilung der Flavonoide in verschiedenen Regionen im ZNS geben. Dies ist insofern von Interesse, als Studien belegen, dass bestimmte Gehirnareale in der Frühphase von Morbus Alzheimer betroffen sind. Braak H. und Braak E. (1991) haben umfangreiche Untersuchungen über die morphologischen Veränderungen des Gehirns, die durch Alzheimer verursacht werden, durchgeführt. Sie definierten sechs neuropathologische Stadien (Braak-Stadien I-VI), die der Schädigung des neuronalen Gewebes entsprechen. Diese Stadien spiegeln das Vorhandensein von intrazellulären, unlöslichen Faserstoffen wieder, die teilweise aus extrem unphosphoriliertem Proteintau bestehen. Die Schädigungen werden in gut definierten Bereichen des Gehirns lokalisiert:

- ▲ enthorhinal (Stadium I-II), klinisch symptomlose Fälle
- ▲ limbic (Stadium III-IV), beginnende Alzheimer Krankheit
- ▲ isocortical (Stadium V-VI), vollständig entwickelter Alzheimer

Die Schäden im Hippocampus fangen schon ab Stadium II durch die NFT-Pathology (neurofibrillary tangles) an, gefolgt vom Striatum in Stadien III-IV. Die ersten Anzeichen einer Beteiligung des frontalen Cortexes sind schon im Stadium III-IV zu sehen. Das Kleinhirn ist im Wesentlichen nicht in der Braak-Einteilung enthalten, da Braak & Braak nur das Großhirn untersucht hatten. Andere Studien legen nahe, dass es keine wesentliche NFT-Pathologie im Kleinhirn bei AD gibt.

Es ist zu beachten, dass die o.g. Stadieneinteilung nicht statisch sondern dynamisch ist d.h., auch wenn ein bestimmtes Hirnareal schon im Stadium II oder III erste Anzeichen von NFT zeigt, so kann der Befall dieser Region in späteren Stadien noch viel stärker ausgeprägt sein.

Daneben konnte in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Studien für definierte Regionen bestimmte Schädigungen oder Defizite nachgewiesen werden. So treten z.B. im Bereich des frontalen Cortex oxidative Schädigungen auf, die im Zusammenhang mit Apolipoprotein-E-Genotyp stehen (Ramassamy et al., 1999). Eine hohe Konzentration an antioxidativ wirksamen Flavonoiden in diesem Gehirnareal könnte, als Teil einer Gesamtwirkung des *Ginkgo biloba* Extraktes, hier durchaus einer Schädigung vorbeugen.

Eine andere *in vitro* Studie zeigte, dass die Flavonoide aus dem EGb 761 Extrakt die Verminderung von synaptosomaler Aufnahme von Dopamin im Striatum und Serotonin in dem Cortex verhindert wurde, möglicherweise bei Fängen von Radikalen, die im Inkubationsmilieu produziert werden (Ramassamy et al., 1992). Weitere *in vitro* Untersuchungen zeigten die protektiven Effekte der Flavonoide gegen OH-Radikal-induzierter Apoptose von Körnerzellen im Bereich des Kleinhirns (Chen et al., 1999; Wei et al., 2000; Xin et al., 2000). Ramassamy et al. (1992) zeigten in einer *in vitro* Studie, dass die Flavonoide aus EGb 761 die Verminderung von synaptosomaler Aufnahme von Dopamin im Striatum und Serotonin in dem Cortex in ein peroxidatives Milieu (Ascorbinsäure-Eisenionen) verhindert.

Die nun vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Nachweis der Flavonoide im ZNS auch im Falle der Gabe einer 100 mg/kg Dosis EGb 761 geführt werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich eine bevorzugte Verteilung der Flavonoide in den untersuchten Hirnregionen Hippocampus, Striatum, Kleinhirn und frontaler Cortex, während im restlichen Hirn nur vergleichsweise geringe Konzentrationen gefunden wurden. Auch konnte hier erstmals Quercetin, bei Gabe von 600 mg/kg Extrakt EGb 761, nachgewiesen werden. In den vorangegangenen Untersuchungen scheiterte der Nachweis wegen der geringen Empfindlichkeit der analytischen Methode für Quercetin. Erst bei der getrennten Aufarbeitung und Analyse der einzelnen Areale gelang der Nachweis, da im Hippocampus, Striatum, Kleinhirn und frontalem Cortex vergleichsweise hohe Quercetinkonzentrationen vorlagen.

Interessant sind auch die Ergebnisse nach Gabe von 100 mg/kg. Hierbei fällt auf, dass vor allem Isorhamnetin/Tamarixetin in allen untersuchten Gehirnarealen in Konzentrationen nachweisbar waren, die ungefähr 50% der Konzentration der 600 mg/kg Dosis entsprachen. Bei Kämpferol war dies nur im frontalen Cortex der Fall, in allen anderen Geweben war bei dieser Dosis die Kämpferolkonzentration unter der Nachweisgrenze.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse eindrucksvoll belegen, dass die Ginkgoflavonoide bzw. deren Metaboliten in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und genau jene Regionen im ZNS zu erreichen, die bekanntermaßen in den frühen Stadien von Morbus Alzheimer geschädigt werden. Signifikante Konzentrationen im ZNS werden allerdings erst nach mehrtägiger Extraktgabe erreicht, da es zu einer nicht unerheblichen Ansammlung der Flavonoide in diesen Hirnarealen kommt. Diese Ergebnisse, sowie die Daten aus pharmakologischen *in vitro* und *in vivo* Studien erhärten den Verdacht, dass die Flavonoide maßgeblich an der Wirkung des Ginkgoextraktes EGb 761 beteiligt sind. Über welche molekularen Mechanismen die Flavonoide ihre Wirkung vermitteln, ist noch nicht im Detail geklärt, jedoch scheinen die antioxidativen Eigenschaften dieser Substanzklasse eine bedeutende Rolle zu spielen.

## 6. DISCUSSION

The proof of clinical efficacy of Ginkgo extract preparations in the early stages of Alzheimer's disease could be provided without doubt. Most of the placebo-controlled studies providing evidence are mainly available for the special extract EGb 761, while there are very few studies for other extracts, for example LI 1370. In addition, there are countless other Ginkgo products on the market, some of unclear origin. These products often do not comply with the criteria of the monograph of the European Commission E and will therefore not be considered in the following discussion.

Alzheimer's disease is undoubtedly a multifactor illness with a whole range of possible causes. Hence, a genetic disposition, particularly in early-onset, plays a significant role. On the other hand, aging is with certainty the highest risk factor for the development of Alzheimer's disease.

In the past 25 years, new causes of Alzheimer's disease have increasingly been suggested, such as loss of cholinergic neurons, neurological inflammation, apoptosis, excessive activation of the NMDA receptors, cholesterol and amyloid deposits. Each of these causes is a potential target area for Alzheimer's therapy. While some substances have already been successfully introduced into therapy, such as cholinesterase inhibitors or NMDA receptor antagonists, other treatment strategies are still in the experimental stage.

In addition to the above mentioned causes, a set of studies suggests that oxidative stress could be a key factor in the formation and progression of Alzheimer's dementia. Together with the synthetic chemical substances, the special Ginkgo extract EGb 761 is the only natural alternative with proven efficacy in the treatment of Alzheimer's disease.

Although Ginkgo ranks among the best studied medicinal plants, its molecular mechanisms of action have not been described in detail until now. The data known so far suggest that EGb 761 act in a multitude of ways, i.e. that it positively influences the beta-amyloid peptide metabolism, has a pro-cholinergic effect, reduces the blood cholesterol level, has an anti-inflammatory impact, and is a powerful antioxidant. This variety of effects is essentially attributed to two classes of substances: the terpene lactones and the flavonoids. A basic condition for taking part in the effect of the extract is, however, that

these substances must be absorbed in the systemic circulation after oral administration, or are capable of overcoming the blood brain barrier.

There is relatively little data on the bioavailability of Ginkgo constituents. Regarding terpenoids, there are only three pharmacokinetic studies on animals (Biber and Koch, 1999) and on human healthy subjects (Fourtillan et al., 1995; Biber, 2003). Concerning the Ginkgo flavonoids, a pilot study is available, in which only the total amount of flavonoids in plasma after oral administration of extract LI 1370 was determined (Nieder, 1991). In addition, there is a further study in which the bioequivalence of three different pharmaceutical forms of Ginkgo after an oral dose was investigated with respect to the flavonoid aglycones (Wojcicki et al., 1995). But the fact remains that the bioavailability of the ingredients in Ginkgo which are responsible for its actions has not yet been fully investigated and that the evidence of bioavailability in the CNS has been provided neither for ginkgolides or bilobalid nor for flavonoid glycosides.

This work is the first one which provides a detailed picture of the pharmacokinetics of Ginkgo flavonoids. The investigation was carried out considering the fact that, after oral administration the flavonoids are subject to degradation already in the gastrointestinal tract, and that an extensive metabolism of the substances takes place following the absorption to the systemic circulation. Because of this, the common aglycones quercetin, kaempferol, and isorhamnetin/tamarixetin were chosen as analytes. They were obtained easily by carrying out an acid hydrolysis at 90°C from the plasma and brain samples. Thus, we covered the entire spectrum of flavonoids that can be found in the extract as well as all metabolites.

The results of the first animal experiment (single dose of 600 mg of extract per kg body weight) clearly showed that the flavonoids were available in the systemic circulation. The highest plasma levels were measured for the aglycone kaempferol (about 350 ng/mL), followed by quercetin and isorhamnetin/tamarixetin with each about 170 ng/mL.

It must however be noted that the flavonoids are ubiquitous in nature and because of it, animals take certain quantity of flavonoids in their natural diet. Hence, it is not surprising that in the plasma of rats, which did not received any extract, but were fed with

common fodder, equally high amount of quercetin were found (Paulke et al., 2008). Similar observations were made by Hollman and Katan (1997).

Considering the concentration-time-curves it attracts immediate attention that even 24 hours after administration of the extract unusually high concentrations in the blood can be found. Then, a repeated administration once daily for 8 days, led to a significant increase in the plasma levels of all flavonoid metabolites. Concerning kaempferol and isorhamnetin/tamarixetin, an increase in the plasma concentration in this short period by more than a factor of 10 was observed. The effect observed for quercetin was less pronounced.

In sum it can be stated that after a repeated administration of Ginkgo extract EGb 761 significantly higher plasma levels can be reached than after a natural diet. Even when reducing the daily dose from 600 to 100 mg/kg, significantly higher plasma levels were measured than in the untreated group. Thus, a continuous administration over a longer period, as this is the case in the treatment of Alzheimer's disease with Ginkgo extracts, seems to be a necessary condition to obtain an effective plasma concentration of flavonoids.

The investigation of the brain provided very interesting results. For the first time it was possible to provide evidence for the existence of Ginkgo flavonoids and their metabolites in the CNS of animals after oral administration of a standardized ginkgo extract. As by the plasma investigations, it was possible to observe a significant increase of the concentration of flavonoids in the CNS with the prolonged administration of the extract. It should be noted at this point that even after several days of administration (8 days), there was no evidence of quercetin in the CNS. This can partly be explained by the lower sensitivity of the analytical method for quercetin.

It was also notable that the increase of flavonoid concentration in the CNS over time was not as pronounced as in plasma. While the concentration of kaempferol and isorhamnetin/tamarixetin in plasma between day 1 and day 8 differed by a factor of 10, the concentrations measured in CNS was only a little bit more than doubled during the same period of time. It should be noted, however, that the dose of 600 mg/kg cannot be compared with the therapeutic doses in humans. This factor and the fact that the concentrations in the central nervous system after administration of 600 mg/kg of the extract

during more than 8 days were comparatively high, led us to carry out an experiment at a lower dose, i.e. 100 mg/kg.

At the same time, this study should reveal the distribution of flavonoids in different regions of the CNS. This is of interest, as studies show that certain areas of the CNS are affected in the early stages of Alzheimer's disease. Braak H. and Braak E. (1991) have conducted extensive studies on the morphological changes in the brain caused by Alzheimer's disease, and defined six neuropathological stages (Braak stages I-VI), which correspond to the damage in the neuronal tissue. These stages reflect the presence of intracellular, insoluble fiber tangles which in part consist of extremely unphosphorylated protein tau. The damages will be located in well-defined areas of the brain:

- ▲ entorhinal (stage I-II), clinically cases without symptoms
- ▲ limbic (stage III-IV), incipient Alzheimer's disease
- ▲ isocortical (stage V-VI), fully developed Alzheimer's

The damage in the hippocampus initiate already in stage II with the NFT-Pathology (neuro-fibrillary tangles), followed by the striatum in stages III-IV. The first signs of involvement of the frontal cortex can be seen already during the stages III-IV. The cerebellum is not included in the Braak's classification, since Braak & Braak only studied the Cerebrum. Other studies suggest that there is no significant NFT-pathology in Cerebellum by the AD.

It should be noted that the above mentioned classification into various stages is not static but dynamic, i.e. even if a certain brain area shows the first signs of NFT already in stage II or III, the involvement of this region in later stages could be even more pronounced.

In addition, several *in vivo* and *in vitro* studies have provided evidence for damages or deficits in certain defined regions of the brain. In the frontal cortex, for example, oxidative damages could be observed, which can be linked to the apolipoprotein E genotype (Ramassamy, et al., 1999). A high concentration of effective antioxidative flavonoids in this brain area, as part of an overall impact of the Ginkgo biloba extracts, could actually prevent damage. A different *in vitro* study showed that the flavonoids from the extract are responsible for the preservation of the uptake of neurotransmitters as dopamine in striatum and serotonin in the cortex by synaptosomes immersed in an oxidative milieu

(Ramassamy, et al., 1992). Another *in vitro* study shows that protective effects of flavonoids could prevent the loss of neurons through apoptosis of cerebellar granular cells caused by OH radicals (Chen et al., 1999; Wei et. al, 2000; Xin et al., 2000).

The present results clearly evidence the presence of flavonoids in the CNS after administering a dose of 100 mg/kg EGb 761. Moreover, a preferred distribution of flavonoids in the examined brain areas hippocampus, striatum, cerebellum and frontal cortex were found, while in the rest of the brain only relatively low concentrations were found. Additionally, after administering 600 mg/kg of the extract, it was possible to proof the presence of quercetin in the brain. In previous studies the presence of quercetin could not be proven because of the low sensitivity of the analytical method for quercetin. However, through separate processing and analysis of the individual areas, evidence of the accumulation of high concentrations of quercetin in the hippocampus, striatum, cerebellum, and frontal cortex was provided.

Equally interesting were the results of the dose with 100 mg/kg. Here, we noted that in all investigated areas of the brain certain concentrations of isorhamnetin/tamarixetin were detected, which corresponded to approximately 50% to the concentration of the dose of 600 mg/kg. Kaempferol could only be detected in the frontal cortex, in all other tissues its concentration at this dose was below the detection limit.

In summary, the results impressively demonstrate that ginkgo flavonoids and their metabolites are able to overcome the blood brain barrier and reach exactly those areas in the CNS, which are known to suffer damage in the early stages of Alzheimer's disease. Significant concentrations in the CNS, however, are only accomplished after administering the extract for several days, as this leads to a highly significant accumulation of flavonoids in these areas of the brain. These results, as well as data from *in vitro* and *in vivo* pharmacology studies, support the assumption that the flavonoids significantly contribute to the impact of Ginkgo extract EGb 761. It has not yet been clarified in detail, which molecular mechanisms are responsible for the actions of the flavonoids, but it appears that the anti oxidative properties of this group of substances play a significant role in these mechanisms.

## 7. GERÄTE UND MATERIALIEN

### 7.1. Bioanalytik und Bioverfügbarkeit der Flavonoide

Die Referenzsubstanzen, Extrakte, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Flavonoiduntersuchungen verwendet wurden, sind nachfolgend aufgeführt.

#### 7.1.1. Extrakt, Referenzsubstanzen und Tiere

##### Extrakt

*Ginkgo biloba* Extrakt EGb 761<sup>®</sup>, standardisiert auf 22-27% Gesamtflavonoide und 5-7% Terpenlaktone, von Dr. W. Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe.

##### Referenzsubstanzen

Produkt	Herkunft
Kämpferol (HPLC > 96%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Quercetin dihydrate (> 99%)	Acros Organics, NJ, USA
Isorhamnetin (HPLC > 99%)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

##### Tiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten (6-7 Wochen alt, 200-220 g schwer) wurden von der Firma Janvier, Le-Genest St. Insel, Frankreich, geliefert und von der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

#### 7.1.2. Lösungsmittel und Chemikalien

Produkt	Herkunft
Acetonitril für Gradientanalyse	Acros Organics, NJ, USA
Methanol für Gradientanalyse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloressigsäure (99%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchloracetat (98%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>tert</i> -Butylhydrochinon (TBHQ, HPLC Grad)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS-HCl (99%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agar	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure Suprapur <sup>®</sup> (30%)	Merck KGaA, Darmstadt
Aluminiumnitrate Nonahydrat (≥ 98,5%)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure zur Analyse (100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt
Milli-Q Wasser	

### *Lösungsvorbereitung*

Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen wurden mit Millipore-Wasser oder einem organischen Lösungsmittel frisch hergestellt. Die Einstellung des geforderten pH-Werts erfolgte mit einem täglich neu kalibrierten pH-Meter unter Verwendung verdünnter Salzsäure- oder Natriumhydroxid-Lösung.

### *Stammlösungen*

- ▲ Stammlösung von Quercetin 200 µg/mL in MeOH
- ▲ Stammlösung von Kämpferol 200 µg/mL in MeOH
- ▲ Stammlösung von Isorhamnetin 200 µg/mL in THF

Die Stammlösungen wurden nach der Herstellung jeweils in kleinen Flaschen bei  $-70\text{ °C}$  gelagert. Für jedes Experiment wurde jeweils eine Flasche der entsprechenden Stammlösung verwendet und daraus frische Standardlösungen bereitet.

### *Standardlösungen*

Die Standardlösungen wurden aus der jeweiligen Stammlösung bereitet, indem ein entsprechendes Aliquot der Stammlösung mit MeOH oder H<sub>2</sub>O verdünnt wurde.

### *Mobile Phase*

Für die organische Phase wurde durch Ultraschall entgastes Acetonitril verwendet. Für die wasserhaltige Phase wurde ein Puffer aus Chloressigsäure und Natriumchloracetat mit einer Gesamtkonzentration von 0,025 M hergestellt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 2,4 eingestellt. Zum Schluss wurde die Lösung durch Vakuum entgast.

## **7.1.3. Geräte und Zubehör**

### *HPLC Anlage*

Ein Varian Pro Star Gerät (Varian, Inc. Walnut Creek, CA), bestehend aus den Abbildung 52 dargestellten Komponenten:

- ▲ Pumpe A bzw. Pumpe B Modell 210
- ▲ On-line Degasser Degasys Modell DG-1210
- ▲ Autosampler Modell 410
- ▲ (UV Detektor Modell 330)
- ▲ Fluoreszenzdetektor Modell 363

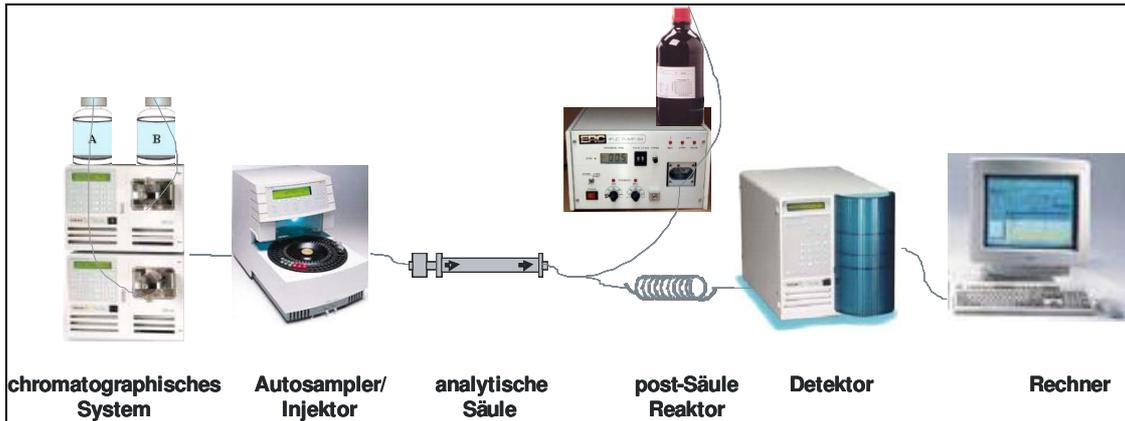


Abbildung 52. Schematische Darstellung der verwendete HPLC-FD Anlage.

### Zusätzliche Teile

Produkt	Herkunft
Knauer-Pumpe Modell 64	Knauer, Berlin.
CTFE-Mixing-T-Stück	CS-Chromatographie Service, GmbH, Langerwehe
PTFE-Kapillarreaktor (5 m x 0,5 mm I.D.)	CS-Chromatographie Service, GmbH, Langerwehe

### Säulen

Die verwendeten Säulen wurden von der Firma CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe geliefert.

- ▲ Multosphere Säule 120 RP 18 HP-5  $\mu$ , 125 x 4 mm.
- ▲ Multosphere Vorsäulenkartuschen 100 RP 18-5 10 x 4 mm.
- ▲ Discovery HS PEG Säule 5  $\mu$ , 150 x 4,6 mm
- ▲ Discovery HS PEG Vorsäule 5  $\mu$ , 20 x 4 mm

*Sonstige Geräte und Materialien*

Produkt	Herkunft
Kohlendioxid-Kammer	Eigenbau
Heraus Megafuge 1.0 R	Heraus Sepatech GmbH, Osterode
Hochleistungs-Kühlzentrifuge-Heraus Biofuge Primo R	Beckman, München
Homogenisator Potter-S, mit Teflonpistil	Braun, Melsungen
Verdampfer 67386101	Liebisch GmbH, Bielefeld
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus Instrument GmbH, Hanau
Analysenwaage Mettler AT 261 Delta Range	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Laborwaage AB 104	Mettler Toledo GmbH, Gießen
pH-Meter CG 841	Schott Glas, Mainz
Vortex Typ VF2	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co KG, Staufen
Aluminiumblock	Liebisch, Bielefeld
Heizplatte/Magnetrührer Typ RCT B	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co KG, Staufen
Ultraschallbad Sonorex RK 106	Bandelin Electronic GmbH, Berlin
Milli-Q System	Millipore, Bedford, MA
Braunglas-HPLC-Vials 2 mL	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Variable Eppendorf Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten-Tips, 0-100, 100-1000 und 500-2500 µL,	Eppendorf AG, Hamburg
Schlundsonde	Metall-Kopfkanüle, Aesculap AG, Tuttlingen
Li-Heparin-Monovettes 16 I.E.Heparin/mL Blut	Sarstedt
Eppendorf Vials, 1,5 und 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Septen	
Schraubkappen mit Loch	
Präparierbesteck	
Homogenisator-Gefäße mit Glasspistil 20 mL	
Glasspipetten 5, 10 und 20 mL	
PE-Röhrchen 50 mL	
Zentrifugengläser 15 mL	
Messkolben unterschiedliche Volumen	
Magnetfilterhalter Solvac TM	
Star Chromatography Workstation 5.5	

## 7.2. Proteomicsstudie

Die Referenzsubstanzen, Extrakte, Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Flavonoid-Untersuchungen verwendet wurden, sind nachfolgend aufgeführt.

### 7.2.1. Extrakt und Tiere

#### Extrakt

*Ginkgo biloba* Extrakt EGb 761<sup>®</sup>, standardisiert auf 22-27% Gesamtflavonoide und 5-7% Terpenlaktone, von Dr. W. Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe

#### Tiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten (6-7 Wochen alt, 200-220 g schwer) wurden von der Firma Janvier, Le-Genest St. Insel, Frankreich geliefert und von der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel, Karlsruhe zur Verfügung gestellt.

### 7.2.2. Lösungsmittel und Chemikalien

Produkt	Herkunft
Tris-(hydroxymethyl)- Aminomethanhydrochlorid (99%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Salzsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol	Fluka Chemie, Buchs
Aminocaprinsäure	Fluka Chemie, Buchs
Ethylendiamintetracetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dodecylmaltosid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Serva Blue G (Coomasie Blue G-250)	Serva, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Serva, Deutschland
Acrylamid	Serva, Deutschland
Bisacrylamid	Serva, Deutschland
Amoniumpersulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tetramethylethylendiamin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tricin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdeoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Milli-Q Water	

*Lösungsvorbereitung*

Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen wurden mit Millipore-Wasser oder einem organischen Lösungsmittel frisch hergestellt. Die Einstellung des geforderten pH-Wert erfolgte mit einem täglich neu kalibrierten pH-Meter unter Verwendung verdünnter Salzsäure- oder NaOH-Lösung.

*Sucrose Puffer*

Diese Lösung wurde für die Homogenisierung der Gehirnprouben verwendet. Es wurde in Wasser vorbereitet und enthält folgende Substanzen/Konzentrationen:

- ▲ 250 mM Sucrose
- ▲ 20 mM  $\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_3$
- ▲ pH = 7,0

*Resuspensionslösung*

Diese Lösung wurde für die Probenaufarbeitung für die BN-PAGE bzw. hrCN-PAGE erstellt. Sie wurde in Wasser vorbereitet und enthielt folgende Substanzen/Konzentrationen:

- ▲ 40 mM NaCl
- ▲ 50 mM Imidazol
- ▲ 2 mM Aminocaprinsäure
- ▲ 1 mM EDTA

*Ladungslösung für hrCN-PAGE Gele*

- ▲ 50 % Glycerol
- ▲ 0,1% Ponceau S

*Acrylamide/Bisacrylamide (AB) Lösung*

49,5% Acrylamide, davon 3,0% Bisacrylamide

*Anodenpuffer Native für BN- und hrCN-PAGE*

- ▲ 25 mM Imidazol
- ▲ pH = 7,0 (mit HCl)

*Blau Native Gel Puffer 3x (BN-GP)*

- ▲ 75 mM Imidazol
- ▲ 1,5 mM Aminocaprinsäure
- ▲ pH = 7.0
- ▲ kalt ansetzen

3x bedeutet, die Lösung ist 3-Fach konzentriert, d.h., sie sollte für in die anschließende Lösung 3-Fach verdünnt werden.

*Kathodenpuffer Native für BN-PAGE*

- ▲ 50 mM Tricine
- ▲ 7,5 mM Imidazol
- ▲ pH = 7,0 mit HCl/NaOH
- ▲ 0,02% Serva Blue G

*Kathodenpuffer Native für hrCNE-PAGE*

- ▲ 50 mM Tricine
- ▲ 7,5 mM Imidazol
- ▲ pH = 7,0 mit HCl/NaOH
- ▲ 0,02% Dodecylmaltoside
- ▲ 0,05% Natrium Deoxycholol

*SDS-Gel Puffer (SDS-GP)*

- ▲ 3M TRIS Puffer
- ▲ 0,3% SDS
- ▲ pH = 8,45

*Andere Lösungen*

- ▲ 10% Dodecylmaltoside in Wasser
- ▲ 5% Serva Blue G/500mM Aminocaprinsäure in Wasser
- ▲ 1% Agarose in Wasser

### 7.2.3. Gel-Vorbereitung

#### Native Gele

Für die Herstellung der Gele für die native Elektrophorese wurden zunächst die in Tabelle 19 aufgelisteten Lösungen erstellt. Diese Tabelle beschreibt die Anteile an Polyacrylamid (AB), Gelpuffer und Polymerisation-Katalysatoren bei der Herstellung von 4-13% und 4-16% Gele.

Tabelle 19. Zusammensetzung der Trenngellösungen für die native Elektrophorese.

Lösung	Gradient Gel 4%	Gradient Gel 13%	Gradient Gel 16%
Glycerin	-	9 g	9 g
Acrylamid Mischung* (AB)	4,4 mL	11,8 mL	14,5 mL
Native Puffer (BN-GP) (3x)*, kalt ansetzen	18,3 mL	15 mL	15 mL
H <sub>2</sub> O benötigt für eine Volumina von	55 mL	45 mL	45 mL
		Rühren	
APS 10% (frisch hergestellt)	300 µL	150 µL	150 µL
TEMED	30 µL	15 µL	µL

\*s. 7.2.2 für Herstellung

Für das Gießen eines Polyacrylamidgradienten wurden folgende Komponenten gemäß Abbildung 53 angeordnet: Gradientmischer, Glasplattensystem, Schlauch und eine Pumpe.

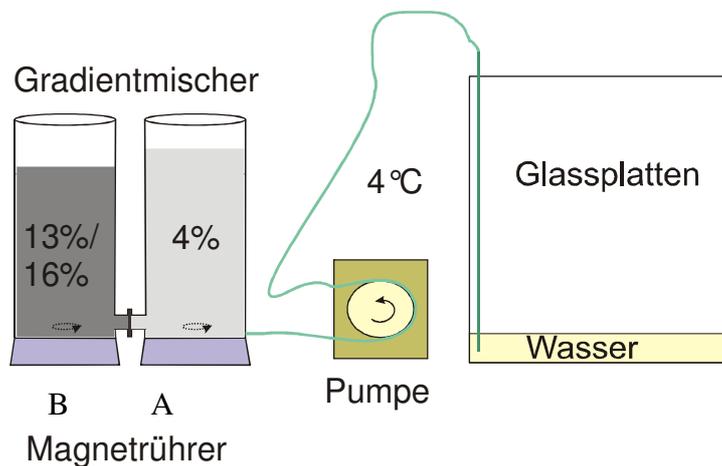


Abbildung 53. Gradientengelsystem vor dem Eingießend des Gels.

Das Glasplattensystem bestand aus zwei Glasplatten von jeweils 18x18 cm Fläche, die mit Hilfe von Agarose 1% und Abstandhaltern (Spacern) in einen Abstand von 1,4 mm zusammengebaut wurden. Der resultierende Innenraum für das Gel betrug 14x14x0,14

cm. Zur Vermeidung der früheren Polymerisierung des Gradientengels beim Eintritt in das Glasplattensystem wurden diese Arbeitsschritte in einer Kühlbox durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde das Glasplattensystem mit 1 mL reinen Wassers gefüllt, um später die Sauerstoffblasen der radikalischen Reaktion vom Gel fernzuhalten.

Anschließend wurde die 4%-Lösung (ohne APS und TEMED) in den vorderen Teil A eingefüllt. Mit dieser Lösung wurde die kleine Verbindung zwischen den beide Gefäße gefüllt, um Blasen zu vermeiden. Danach wurde die 13%-Lösung in den hinteren Teil B des Gradientmischers mitsamt den Rührkernen eingefüllt, beiden Teilen APS und TEMED hinzugegeben und mit den jeweiligen Lösungen vermischt. Die Ventile zwischen Teil A und B des Gradientmischers sowie Teil A des Gradientmischers und dem Schlauch waren zu diesem Zeitpunkt noch geschlossen.

Im dritten Schritt wurde das Ventil zwischen Teil A und der Pumpe des Gradientmischers geöffnet, bis der Innenraum des Glasplattensystems teilweise und der Schlauch vollständig mit der Lösung gefüllt waren. Anschließend wurde das Ventil zwischen den beiden Teilen des Gradientmischers geöffnet, bis das Gemisch aus A und B sich auf bis etwa 1,5 cm unterhalb des oberen Randes der beiden Glasplatten angefüllt hatte (s. Abbildung 54).

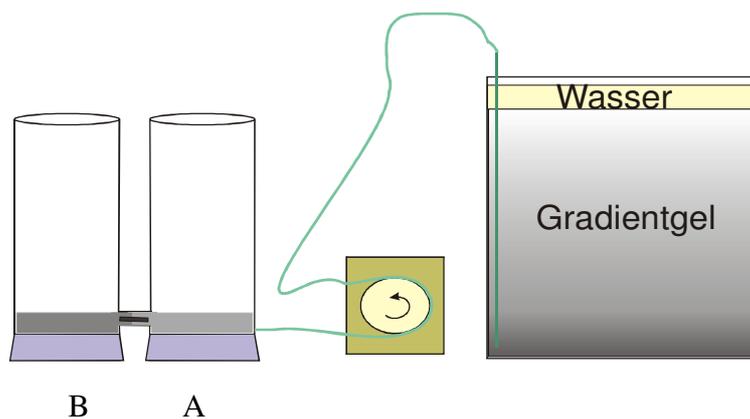


Abbildung 54. Gradientengelsystem nach dem Eingießen des Gels.

Dann wurde die Pumpe gestoppt und das Schlauchsystem entfernt, damit das Gel bei Raumtemperatur polymerisieren konnte. Das Schlauchsystem wurde nun mit reinem Wasser abgespült und anschließend das Wasser mit Luft entfernt, um Polymerisierung von Polyacrylamid zu vermeiden.

Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Wasser vom oberen Teil des Gels entfernt, die Sammelgellösung mit Hilfe einer Pasteurpipette in das Gelsystem manuell eingegossen (s. Tabelle 20) und ein Taschenkamm eingesetzt. Nach dem Polymerisieren (ca. 30 min bei Raumtemperatur) wurde dieser wieder entfernt und das Gelsystem entweder sofort verwendet oder mit nativem Puffer (BN-GP) überdeckt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 20. Zusammensetzung der Sammelgellösung für die native Elektrophorese.

Sample Gel	3,5%
AB Lösung*	1,75 mL
BN-GP (3x)*	8,3 mL
H <sub>2</sub> O bis	25 mL
Rühren	
APS 10% (frisch hergestellt)	200 µL
TEMED	20 µL
Rühren	

\*s. 7.2.2 für Herstellung

### SDS-Gele

Tabelle 21. Zusammensetzung der Gellösungen für die denaturierende SDS-Elektrophorese.

SDS-Gel	90 mL (6 Gels) 10% SDS	90 mL (6 Gels) 16% SDS
AB Lösung*	18	30 mL
SDS-GP (3x)*	30	30 mL
Glycerol	9	9 mL
Wasser	bis 90 mL	bis 90 mL
APS 10% (frisch hergestellt)	450 µL	450 µL
TEMED	45 µL	45 µL

\*s. 7.2.2 für Herstellung

Tabelle 22. Zusammensetzung der nativen Seitengellösung für die SDS-Elektrophorese.

Native-Sample Gel 10%	(6 Gels, 25 mL)
AB Lösung*	5 mL
BN-GP (3x)*, kalt ansetzen	8,3 mL
Glycerol	2,5 g
Wasser	Ad 25 mL
APS 10% (fresh hergestellt)	130 µL
TEMED	13 µL

\*s. 7.2.2 für Herstellung

### 7.2.4. Geräte und Zubehör

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Produkt	Herkunft
<b>Probenentnahme:</b>	
Kohlendioxid-Kammer	Eigenbau
Microfuge R	Beckman, München
<b>Probenaufarbeitung:</b>	
Homogenisator Eurostar	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Biofuge Primo R Heraeus	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ultrazentrifuge L6-65	Beckman, München
<b>Gel – Gießen:</b>	
Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pumpe 2120 Varioperpex II	LKW Bromma, Schweden
Gradienten-Gießapparatur, 100 mL	Eigenbau
<b>Elektrophorese:</b>	
BNE-Kammer	Eigenbau
Consort E835 Electrophoresis	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Power Supply 800 Series	Fröbel Labortechnik
<b>Protein Quantifizierung:</b>	
Chemi Doc XRS	BIO-RAD
<b>Sonstige Geräte:</b>	
Laborwaage Satorius BP 2215	Sartorius AG, Mechatronic, Göttingen
Analysenwaage Mettler AE 160	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Analysenwaage Mettler Toledo Pb1502-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
pH-Meter E603	Metrohm AG, Herisau/ Schweiz
Vortex	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Heizbad	Kotterman GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Gel-Schüttelapparat	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Milli-Q System, GenPure und Pacific	TKAWater Purification Systems GmbH, Niederelbert
<b>Extraktverabreichung:</b>	
Schlundsonde, Metall-Kopfkanüle	Aesculap AG, Tuttlingen
Präparierbesteck	Fisher Scientific
Glaspipetten 5, 10 und 20 mL	Fisher Scientific
Polypropylen-Röhrchen 5 mL	Greiner
<b>Probenhomogenisierung:</b>	
Variabel Pippeten Pipetman	Abimed, Langelfeld
Pippeten Tips	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Vials 1,5 und 2 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Messzylinder 100 mL, 1000 mL	Schott Duran, Mainz
Pasteur-Pipetten	Schott Duran, Mainz

Produkt	Herkunft
Rotilabo- Frischhalteboxen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Homogenisator-Gefäße 2 mL	
Pistil aus Stahl mit einem Kopf aus PTFE	
<b>Gele Vorbereitung:</b>	
Spacer 1,4 und 0,7 mm	Eigenbau
Glasplatten 18 x 18 cm	Eigenbau
Schlauch	
Kapillarnadel	
Fotografie-Klammer	
Kämme 0.7 (SDS) und 1.5/1.6 (BNE) mm	Eigenbau
<b>Software:</b>	
BioRad ChemiDoc XRS System	Software Quantity One

## 8. ANHANG: ZUGELASSENE GINGKOPRÄPARATE

Antidementiva aus der Roten Liste 2007

\* Auch als pflanzliche durchblutungsfördernde Mittel.

# Homöopathisches Präparat. NUR zur Förderung der Durchblutung und zur Kräftigung des Adernsystems.

Produktname	Arzneiform	Hersteller	Extrakt
Duogink 3000 *	Dragees	Duopharm	60 mg
Gingiloba <sup>®</sup>	Filmtabletten	1 A Pharma	40 mg
	Lösung		40 mg/mL
Gingium 20 mg <sup>®</sup>	Filmtabletten	Hexal	20 mg
Gingium <sup>®</sup> *			40 mg
Gingium spezial 80 <sup>®</sup> *			80 mg
Gingium intens 120 <sup>®</sup>			120 mg
Gingium <sup>®</sup>	Lösung		40 mg/mL
Gingobeta <sup>®</sup> 40	Filmtabletten	Betapharm	40 mg
Gingobeta <sup>®</sup> Tropfen	Lösung		40 mg/mL
Gingopret <sup>®</sup> *	Filmtabletten	Bionorica	40 mg
Gingopret <sup>®</sup> *	Lösung		40 mg/mL
Ginkgo 40 von ct	Filmtabletten	CR-Arzneimittel	40 mg
Ginkgo 40 von ct Tropfen			40 mg/mL
Ginkgo-ISIS <sup>®</sup> 50 mg *	Filmtabletten	ALPHARMA-ISIS	50 mg
Ginkgo STADA <sup>®</sup> *	Filmtabletten	STADA	40 mg
Ginkgo STADA <sup>®</sup> Tropfen *	Lösung		40 mg/mL
Ginkobil <sup>®</sup> -N ratiopharm	Filmtabletten	ratiopharm	40 mg
Ginkobil <sup>®</sup> ratiopharm Tropfen			40 mg/mL
Ginkodilat <sup>®</sup> 40 mg	Filmtabletten	Sandoz	40 mg
Ginkodilat <sup>®</sup> 40 mg Tropfen	Lösung		40 mg/mL
Ginkopur <sup>®</sup> *	Filmtabletten	Spitzner	40 mg
	Tropfen		40mg/mL
Isoginkgo *	Filmtabletten	Merck dura	40 mg
Kaveri <sup>®</sup> 40 mg/mL *	Tropfen	Lichtwer	40 mg/mL
Kaveri <sup>®</sup> 50 mg *	Filmtabletten		50 mg
Kaveri <sup>®</sup> 120 mg *	Filmtabletten	Lichtwer	120 mg
Rökan <sup>®</sup> 40 mg *	Filmtabletten	Spitzner	40 mg
Rökan <sup>®</sup> 80 mg *	Filmtabletten		80 mg
Rökan <sup>®</sup> Tropfen 40 mg *	Lösung zum Einnehmen		40 mg/mL
Rökan <sup>®</sup> 120 mg *	Filmtabletten	Spitzner	120 mg
SE Ginkgo *	Filmtabletten	Spitzner	40 mg
Tebonin <sup>®</sup> forte 40 mg *	Filmtabletten	Schwabe	40 mg
Tebonin <sup>®</sup> forte 40 mg *	Lösung		40 mg/mL
Tebonin <sup>®</sup> spezial 80 mg *	Filmtabletten		80 mg
Tebonin <sup>®</sup> intens 120 mg *	Filmtabletten		120 mg
Ginkgo 405 Duopharm <sup>#</sup>	Dragees	Duopharm	3 mg Flavonoide

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1. Männlicher und weiblicher Ginkgo-Trieb aus „Flora Japonica“ von Siebold & Zuccarini, Leiden 1835/42..... 1

Abbildung 2. Ginkgofossil. .... 1

Abbildung 3. Ginkgobaum im Sommer (A) und Winter (B); Ginkgoblatt (C)..... 4

Abbildung 4. Weibliche (A) und männliche (B) Ginkgoblüten. .... 4

Abbildung 5. Ginkgofrüchte (A) und -samen (B). .... 5

Abbildung 6. Flavonoide in *Ginkgo biloba* L. .... 6

Abbildung 7. Terpenlaktone aus *Ginkgo biloba* L. .... 7

Abbildung 8. Auswahl von verschiedenen rationalen Ginkgophytopharmaka. .... 11

Abbildung 9. Traditionell angewendetes Ginkgopräparat..... 14

Abbildung 10. Homöopatisches Ginkgopräparat. .... 14

Abbildung 11. Beispiele für Ginkgo-Nahrungsergänzungsmittel. .... 15

Abbildung 12. Konzentrations-Zeit-Verlauf im Plasma von Terpenoiden nach einmaliger Gabe von 1,44, 1,03 und 3,36 mg von Ginkgolid A, Ginkgolid B und Bilobalid an Menschen (Fourtillan et al., 1995). .... 18

Abbildung 13. Möglicher Metabolismus von Flavonoiden..... 20

Abbildung 14. Struktur-Wirkung-Beziehung von Ginkgoliden und PAFR. .... 23

Abbildung 15. Verschiedene Wirkungsmechanismen von Ginkgoextrakt EGb 761. .... 31

Abbildung 16. Stabilität von Aglyka bei Raumtemperatur in saurem Hydrolyse-Milieu (2M HCl, 60% Methanol). Standardkonzentration: 12, 2 bzw. 2,5 ng/mL für Quercetin, Kämpferol bzw. Isorhamnetin..... 37

Abbildung 17. Stabilität bei 90°C in saurem Hydrolyse-Milieu (2M HCl, 60% Methanol). Standardkonzentration: 12, 2 bzw. 2,5 ng/mL für Quercetin, Kämpferol bzw. Isorhamnetin..... 38

Abbildung 18. Vorgeschlagene Mechanismen für die Komplexierung von Quercetin mit Al<sup>(III)</sup> ..... 42

Abbildung 19. Darstellung der entwickelten Methode zur Untersuchung der Plasma- und ZNS-Bioverfügbarkeit von Ginkgoflavonoiden an Ratten. .... 43

Abbildung 20. Typisches Chromatogramm, das mit der für HPLC-FD entwickelten Methode erhalten wurde. Isokratische Trennung, Säule: RP-C18, mobile Phase: 28% ACN. Standard von Quercetin (12 ng/mL), Kämpferol (2 ng/mL) und Isorhamnetin (2,5 ng/mL)..... 44

Abbildung 21. Ermittlung der Linearität des Detektors (n=4). .... 45

Abbildung 22. Typische HPLC-Chromatogramme aus der Analyse von Hirn- und Plasmaproben. Jeweils 10 ng/mL gespikete Konzentration von Quercetin (Q) bzw. 10 ng/mL von Kämpferol (K) und Isorhamnetin (I). .... 46

Abbildung 23. Ermittlung der Linearität der Methode im Plasma (n=3). .... 48

Abbildung 24. Ermittlung der Linearität der Methode im Gehirn (n=3). .... 48

Abbildung 25. Ergebnisse der Ermittlung der Wiederfindung (n=3)..... 52

Abbildung 26. Ermittlung der Richtigkeit und Präzision (n=3)..... 55

Abbildung 27. Abfolge der Probenentnahme. .... 58

Abbildung 28. Optimierung der sauren Hydrolysezeit für die Analyse der Aglyka aus dem EGb 761 Extrakt. ....	60
Abbildung 29. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im Plasma nach Einfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 (n=6). ....	61
Abbildung 30. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im ZNS nach Einfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 (n=6). ....	64
Abbildung 31. Konzentrations-Zeit-Verlauf von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/ Tamarixetin im Plasma nach 8-tägiger Mehrfachgabe von 600 mg/kg EGb 761 (n=6). ....	65
Abbildung 32. Vergleich des Konzentrations-Zeit-Verlauf von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im Plasma nach Einfachgabe [Tag 1] und 8-tägiger Mehrfachgabe [Tag8] von 600 mg/kg EGb 761. ....	66
Abbildung 33. Vergleich des Konzentrations-Zeit-Verlauf von Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin im Gehirn nach Einfachgabe [Tag 1] und 8-tägiger Mehrfachgabe [Tag8] von 600 mg/kg EGb 761. ....	68
Abbildung 34. Vergleich der Plasmakonzentration von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin/Tamarixetin nach 8-tägiger Mehrfachgabe von 600 bzw. 100 mg/kg EGb 761. ....	69
Abbildung 35. Relativer Gewichtsanteil unterschiedlicher Hirnareale von 6 bis 7 Wochen alten, männlichen Sprague-Dawley Ratten (n=14). ....	69
Abbildung 36. Verteilung von Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin im Gehirn nach 8-tägiger Mehrfachgabe von 600 bzw. 100 mg/kg EGb 761. Probenentnahme 4 Stunden nach der letzten Gabe. ....	70
Abbildung 37. Aufbau einer Mitochondrie. ....	73
Abbildung 38. Atmungskette der Proteinkomplexe. ....	74
Abbildung 39. Trennung von Makromolekülen in einer Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur. Modifiziert nach (Berg et al., 2003). ....	77
Abbildung 40. Bildung von Sulfatradikalen. ....	78
Abbildung 41. Polymerisation von Acrylamid. ....	78
Abbildung 42. Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese. ....	79
Abbildung 43. Homogenisierung der Proben aus frontalem Cortex von Ratten. ....	84
Abbildung 44. Probenaufarbeitung für native Gelelektrophorese. ....	86
Abbildung 45. Zusammensetzung einer vertikalen Elektrophoresekammer. ....	86
Abbildung 46. Aufbau und Durchführungsbedingungen von BN/ hrCN-Gelelektrophoresen. ....	87
Abbildung 47. BN-PAGE und hrCN-PAGE von mitochondrialen Atmungskettenkomplexen von Rattenhirn. Die Detergenzkonzentrationen entsprachen 0,75x, 1x und 1,5x der Konzentration im Standardprotokoll (3 g DDM/g Protein). ....	91
Abbildung 48. Auftrennung der Untereinheiten von mitochondrialen Atmungskettenkomplexen mit BN- bzw. hrCN-PAGE 4-13% für die erste Dimension und SDS-Gel 10% für die zweite Dimension. ....	92

Abbildung 49. In-Gel Aktivität von Komplex I in frontaler Cortex von Kontroll- und Versuchstieren (K1 bzw. G1, G2 und G3), die mit 300 mg/kg KG EGb 761 über 28 Tage gefüttert wurden. Die Prozentwerte entsprechen der relativen Konzentration von Komplex I.....93

Abbildung 50. Aufgetrennte Untereinheiten von Komplex I, III, IV und V, die bei densitometrischer Quantifizierung verwendet wurden. ....94

Abbildung 51. Quantifizierung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe Untereinheiten aus dem frontalen Cortex von Ratten, gefüttert mit 300 mg/kg EGb 761 über 28 Tage. ....95

Abbildung 52. Schematische Darstellung der verwendete HPLC-FD Anlage.....109

Abbildung 53. Gradientensystem vor dem Eingießend des Gels. ....114

Abbildung 54. Gradientensystem nach dem Eingießen des Gels.....115

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1. Ginkgo Systematik .....	3
Tabelle 2. Vorsichtsmaßnahmen und Nebenwirkungen von Ginkgo.....	33
Tabelle 3. Strukturen der wichtigsten Ginkgo-Flavonoidaglyka.....	35
Tabelle 4. Stabilität der Aglyka bei Raumtemperatur in saurem Hydrolyse-Milieu.....	37
Tabelle 5. Stabilität bei 90°C in saurem Hydrolyse-Milieu.....	38
Tabelle 6. Untere Bestimmungsgrenze (LLOQ)–Werte.....	50
Tabelle 7. Ergebnisse der Werte für die Wiederfindung der Methode (n=3).....	53
Tabelle 8. Validierungsparameter für die Bestimmung der Flavonoidaglyka Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin in Gehirn- und Plasmaproben. ....	56
Tabelle 9. Tierstudien-Design.....	59
Tabelle 10. Flavonoidgehalt (als Aglyka) von EGb 761.....	60
Tabelle 12. Pharmakokinetische Parameter der Ginkgo Flavonoide, berechnet als Aglyka, nach oraler Mehrfachgabe von 600 mg /kg EGb 761 Extrakt über acht Tage im Rattenmodell.....	67
Tabelle 13. Zusammensetzung der einzelnen Atmungskettenkomplexe.....	75
Tabelle 14. Gewichtskontrolle des frontalen Cortexes.....	84
Tabelle 15. Benötigte Detergenzmengen für die Solubilisierung von Membranen (Wittig et al., 2006).....	85
Tabelle 16. Design für die Untersuchung der benötigten Detergenzmenge.....	85
Tabelle 17. Silberfärbungsprotokoll .....	89
Tabelle 18. Relative gemessene Konzentrationen bei der In-Gel-Aktivität von Komplex I.....	93
Tabelle 19. Zusammensetzung der Trenngellösungen für die native Elektrophorese.....	114
Tabelle 20. Zusammensetzung der Sammelgellösung für die native Elektrophorese.....	116
Tabelle 21. Zusammensetzung der Gellösungen für die denaturierende SDS- Elektrophorese.....	116
Tabelle 22. Zusammensetzung der nativen Seitengellösung für die SDS- Elektrophorese.....	116

---

**LITERATURVERZEICHNIS**

- Abrahamse SL, Kloots WJ and Amelsvoort JMMv (2005) Absorption, distribution and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutrition Research* **25**:305-317.
- Ader P, Wessmann A and Wolfram S (2000) Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med* **28**:1056-1067.
- Ahlemeyer B and Krieglstein J (2003a) Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell Mol Life Sci* **60**:1779-1792.
- Ahlemeyer B and Krieglstein J (2003b) Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**:S8-14.
- Ahlemeyer B, Selke D, Schaper C, Klumpp S and Krieglstein J (2001) Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *Eur J Pharmacol* **430**:1-7.
- Amri H, Drieu K and 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, Drieu K and Papadopoulos V (2002) Use of ginkgolide B and a ginkgolide-activated response element to control gene transcription: example of the adrenocortical peripheral-type benzodiazepine receptor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **48**:633-639.
- Amri H, Drieu K and Papadopoulos V (2003) Transcriptional suppression of the adrenal cortical peripheral-type benzodiazepine receptor gene and inhibition of steroid synthesis by ginkgolide B. *Biochem Pharmacol* **65**:717-729.
- Amri H, Ogwuegbu SO, Boujrad N, Drieu K and 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.
- Attardi G and Schatz G (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* **4**:289-333.
- Baron-Ruppert G and Luepke NP (2001) Evidence for toxic effects of alkylphenols from Ginkgo biloba in the hen's egg test (HET). *Phytomedicine* **8**:133-138.
- Bastianetto S, Zheng WH and Quirion R (2000) 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* **74**:2268-2277.
- Bazan NG, Colangelo V and Lukiw WJ (2002) Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:197-210.
- BfArM (1994) Liste der Monographien der E-Kommission (Phyto-Therapie), die im Bundesanzeiger veröffentlicht sind, in.
- Biber A (2003) Pharmacokinetics of Ginkgo biloba extracts. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**:S32-37.

- 
- Biber A and Koch E (1999) Bioavailability of ginkgolides and bilobalide from extracts of ginkgo biloba using GC/MS. *Planta Med* **65**:192-193.
- Birks J, Grimley EV and Van Dongen M (2002) Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003120.
- Birks J and Grimley Evans J (2007) Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003120.
- Boekema EJ and Braun HP (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* **282**:1-4.
- Bolarinwa A and Linseisen J (2005) Validated application of a new high-performance liquid chromatographic method for the determination of selected flavonoids and phenolic acids in human plasma using electrochemical detection. *J Chromatogr B* **823**:143-151.
- Braak H and Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* **82**:239-259.
- Braquet P (1986) Proofs of involvement of PAF-acether in various immune disorders using BN 52021 (ginkgolide B): a powerful PAF-acether antagonist isolated from Ginkgo biloba L. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **16**:179-198.
- Bruno C, Cuppini R, Sartini S, Cecchini T, Ambrogini P and Bombardelli E (1993) Regeneration of motor nerves in bilobalide-treated rats. *Planta Med* **59**:302-307.
- Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Runswick MJ, Shannon RJ, Hirst J and Walker JE (2005) The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* **4**:693-699.
- Cermak R, Landgraf S and Wolfram S (2003) The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *Journal of Nutrition* **133**:2802-2807.
- Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Chinopoulos C, Drieu K and Fiskum G (2002) Bilobalide, a component of the Ginkgo biloba extract (EGb 761), protects against neuronal death in global brain ischemia and in glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **48**:663-669.
- Chandrasekaran K, Mehrabian Z, Spinnewyn B, Chinopoulos C, Drieu K and Fiskum G (2003) Neuroprotective effects of bilobalide, a component of Ginkgo biloba extract (EGb 761) in global brain ischemia and in excitotoxicity-induced neuronal death. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**:S89-94.
- Chang TK, Chen J and Yeung EY (2006) Effect of Ginkgo biloba extract on procarcinogen-bioactivating human CYP1 enzymes: identification of isorhamnetin, kaempferol, and quercetin as potent inhibitors of CYP1B1. *Toxicol Appl Pharmacol* **213**:18-26.
- Chatterjee SS, Doelman CJ, Noldner M, Biber A and Koch E (2005) Influence of the Ginkgo extract EGb 761 on rat liver cytochrome P450 and steroid metabolism and excretion in rats and man. *J Pharm Pharmacol* **57**:641-650.
- Chatterjee SS, Kondratskaya EL and Krishtal OA (2003) Structure-activity studies with Ginkgo biloba extract constituents as receptor-gated chloride channel blockers and modulators. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**:S68-77.
-

- Chen C, Wei T, Gao Z, Zhao B, Hou J, Xu H, Xin W and Packer L (1999) Different effects of the constituents of EGb761 on apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals. *Biochem Mol Biol Int* **47**:397-405.
- Chen X, Salwinski S and Lee TJ (1997) Extracts of Ginkgo biloba and ginsenosides exert cerebral vasorelaxation via a nitric oxide pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**:958-959.
- Cheung F, Siow YL, Chen WZ and O K (1999) Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **58**:1665-1673.
- Cheung F, Siow YL and O K (2001) Inhibition by ginkgolides and bilobalide of the production of nitric oxide in macrophages (THP-1) but not in endothelial cells (HUVEC). *Biochem Pharmacol* **61**:503-510.
- Christen Y (2004) Ginkgo biloba and neurodegenerative disorders. *Front Biosci* **9**:3091-3104.
- CHS Coordinating Center UoW, Seattle, WA (2008) The Ginkgo Evaluation of Memory (GEM) Study, in.
- Cornard JP and Merlin JC (2002) Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). *J Inorg Biochem* **92**:19-27.
- Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C and Remesy C (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* **277**:G120-126.
- DAB (2006) Eingestellter Ginkgotrockenextrakt in *Deutsches Arzneibuch* pp 1-6, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
- Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquio A and Heizen H (2003) Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res* **5**:425-432.
- Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR and Williamson G (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* **35**:941-952.
- de Souza RF and De Giovani WF (2005) Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al(III) and Zn(II) complexes with flavonoids. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **61**:1985-1990.
- DeFeudis FV (2002) Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res* **46**:565-568.
- DeFeudis FV (2003) A brief history of EGb 761 and its therapeutic uses. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**:S2-7.
- DeFeudis FV and Drieu K (2000) Ginkgo biloba extract (EGb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr Drug Targets* **1**:25-58.
- Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwel N, Matheis RJ, Noskin O, Richards JA and Schoenberger NE (2000) Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil* **81**:668-678.
- Doly M, Braquet P, Bonhomme B and Meyniel G (1987) Effects of PAF-acether on electrophysiological response of isolated retina. *Int J Tissue React* **9**:33-37.

- Drieu K (1986) Animal distribution and preliminary human kinetic studies of the flavonoid fraction of a standardized Ginkgo extract (EGb 761) *Stud Org Chem*:351-359.
- EAB (2006) Ginkgoblätter, in *Europäisches Arzneibuch* pp 1944-1946, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J and Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* **56**:545-553.
- Europäische-Union (2004) *Richtlinie 2004/04/EG*
- Europäische-Union (2007) *Verordnung 1924/2006*. Amtsblatt der Europäischen Union.
- Fourtillan JB, Brisson AM, Girault J, Ingrand I, Decourt JP, Drieu K, Jouenne P and Biber A (1995) [Pharmacokinetic properties of Bilobalide and Ginkgolides A and B in healthy subjects after intravenous and oral administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761)]. *Therapie* **50**:137-144.
- Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G and Weizman A (1999) Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* **51**:629-650.
- Genast H (2005) *Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen*. Nicol, Hamburg.
- Gong QH, Wu Q, Huang XN, Sun AS and Shi JS (2005) Protective effects of Ginkgo biloba leaf extract on aluminum-induced brain dysfunction in rats. *Life Sci* **77**:140-148.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H and Veit M (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* **41**:492-499.
- Granger AS (2001) Ginkgo biloba precipitating epileptic seizures. *Age Ageing* **30**:523-525.
- Haller CA, Meier KH and Olson KR (2005) Seizures reported in association with use of dietary supplements. *Clin Toxicol (Phila)* **43**:23-30.
- Hänsel R and Sticher O (2004) *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. Heidelberg.
- Harborne JB (1965) Plant polyphenols-XIV. Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *Phytochemistry* **4**:107-120.
- Hasler A, Gross GA, Meier B and Sticher O (1992) Complex flavonol glycosides from the leaves of Ginkgo biloba. *Phytochemistry* **31**:1391-1394.
- Hausen BM (1998) The sensitizing capacity of ginkgolic acids in guinea pigs. *Am J Contact Dermat* **9**:146-148.
- Hauser D, Gayowski T and Singh N (2002) Bleeding complications precipitated by unrecognized Ginkgo biloba use after liver transplantation. *Transpl Int* **15**:377-379.
- Heß D (2005) *Systematische Botanik*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hollman PC (2001) Determination of flavonols in body fluids. *Methods Enzymol* **335**:97-103.
- Hollman PC and Katan MB (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* **51**:305-310.

- Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH and Katan MB (1996a) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* **21**:703-707.
- Hollman PCH, Trijp JMPv and Buysman MNCP (1996b) Fluorescence Detection of Flavonols in HPLC by Postcolumn Chelation with Aluminum. *Anal. Chem.* **68**:3511-3515.
- Ishii K, Furuta T and Kasuya Y (2003) High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **794**:49-56.
- Ivic L, Sands TT, Fishkin N, Nakanishi K, Kriegstein AR and Stromgaard K (2003) Terpene trilactones from Ginkgo biloba are antagonists of cortical glycine and GABA(A) receptors. *J Biol Chem* **278**:49279-49285.
- Janssens D, Delaive E, Remacle J and Michiels C (2000) Protection by bilobalide of the ischaemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity. *Fundam Clin Pharmacol* **14**:193-201.
- Janssens D, Michiels C, Delaive E, Eliaers F, Drieu K and 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, Remacle J, Drieu K and Michiels C (1999) Protection of mitochondrial respiration activity by bilobalide. *Biochem Pharmacol* **58**:109-119.
- Jaracz S, Nakanishi K, Jensen AA and Stromgaard K (2004) Ginkgolides and glycine receptors: a structure-activity relationship study. *Chemistry* **10**:1507-1518.
- Johns L, Sinclair AJ and Davies JA (2002) Effects of bilobalide on hypoxia/hypoglycemia-stimulated glutamate efflux from rat cortical brain slices. *Neurochem Res* **27**:369-371.
- Joyeux M, Lobstein A, Anton R and Mortier F (1995) Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med* **61**:126-129.
- Juretzek W and Müller WE (2002) Qualität und wirksamkeit von Ginkgo-biloba-Extrakt. *Pharmazie in unserer Zeit* **31**:370-374.
- Kadenbach B, Schneyder B, Mell O, Stroh S and Reimann A (1991) Respiratory chain proteins. *Rev Neurol (Paris)* **147**:436-442.
- Karnes HT, Shiu G and Shah VP (1991) Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res* **8**:421-426.
- Kleijnen J and Knipschild P (1992a) Ginkgo biloba. *Lancet* **340**:1136-1139.
- Kleijnen J and Knipschild P (1992b) Ginkgo biloba for cerebral insufficiency. *Br J Clin Pharmacol* **34**:352-358.
- Klein J, Weichel O, Hilgert M, Rupp J, Chatterjee SS and Nawrath H (2003) Excitotoxic hippocampal membrane breakdown and its inhibition by bilobalide: role of chloride fluxes. *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 1**:S78-83.
- Kleinschmidt S, Rump G and Kotter J (2007) Phytopharmaka. *Anaesthesist*:1-10.

- 
- Koch E, Jaggy H and Chatterjee SS (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.
- Koltermann A, Hartkorn A, Koch E, Furst R, Vollmar AM and Zahler S (2007) Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* **64**:1715-1722.
- Kommission-E (1994) *Monographie: Ginkgo folium*.
- Kondratskaya EL, Betz H, Krishtal OA and Laube B (2005) The beta subunit increases the ginkgolide B sensitivity of inhibitory glycine receptors. *Neuropharmacology* **49**:945-951.
- Kondratskaya EL, Lishko PV, Chatterjee SS and Krishtal OA (2002) BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel. *Neurochem Int* **40**:647-653.
- Kubota Y, Kobayashi K, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Umegaki K and Shinozuka K (2004) Pretreatment with Ginkgo biloba extract weakens the hypnosis action of phenobarbital and its plasma concentration in rats. *J Pharm Pharmacol* **56**:401-405.
- Kudolo GB, Wang W, Barrientos J, Elrod R and Blodgett J (2004) The ingestion of Ginkgo biloba extract (EGb 761) inhibits arachidonic acid-mediated platelet aggregation and thromboxane B2 production in healthy volunteers. *J Herb Pharmacother* **4**:13-26.
- Lamant V, Mauco G, Braquet P, Chap H and Douste-Blazy L (1987) Inhibition of the metabolism of platelet activating factor (PAF-acether) by three specific antagonists from Ginkgo biloba. *Biochem Pharmacol* **36**:2749-2752.
- Lian HZ, Kang YF, Yasin A, Bi SP, Shao DL, Chen YJ, Dai LM and Tian LC (2003) Determination of aluminum in environmental and biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography via pre-column complexation with morin. *J Chromatogr A* **993**:179-185.
- Loew D (2002) [Value of Ginkgo biloba in treatment of Alzheimer dementia]. *Wien Med Wochenschr* **152**:418-422.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Luo Y (2006) Alzheimer's disease, the nematode *Caenorhabditis elegans*, and ginkgo biloba leaf extract. *Life Sci* **78**:2066-2072.
- MacLennan KM, Darlington CL and Smith PF (2002) The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol* **67**:235-257.
- MacLennan KM, Smith PF and Darlington CL (1996) Platelet-activating factor in the CNS. *Prog Neurobiol* **50**:585-596.
- Mahadevan S and Park Y (2008) Multifaceted therapeutic benefits of Ginkgo biloba L.: chemistry, efficacy, safety, and uses. *J Food Sci* **73**:R14-19.
- Manach C, Texier O, Regeat F, Agullo G, Demigne C and Remesy C (1996) Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamnetin and quercetin. *J Nutr Biochem* **7**:375-380.
-

- Markowitz JS, Donovan JL, Lindsay DeVane C, Sipkes L and Chavin KD (2003) Multiple-dose administration of Ginkgo biloba did not affect cytochrome P-450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers. *J Clin Psychopharmacol* **23**:576-581.
- Mauri P, De Palma A, Pozzi F, Basilico F, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E and Rossoni G (2006) LC-MS characterization of terpene lactones in plasma of experimental animals treated with Ginkgo biloba extracts Correlation with pharmacological activity. *J Pharm Biomed Anal* **40**:763-768.
- Mauri P, Simonetti P, Gardana C, Minoggio M, Morazzoni P, Bombardelli E and Pietta P (2001) Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of terpene lactones in plasma of volunteers dosed with Ginkgo biloba L. extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **15**:929-934.
- Meins J, Ihrig M and Schubert-Zsilavec M (2005) Ginkgo-Produkte aus dem Internet-handel? *Deutsche Apotheker Zeitung* **145**:60, 61.
- Morand C, Manach C, Donovan J and Remesy C (2001) Preparation and characterization of flavonoid metabolites present in biological samples. *Methods Enzymol* **335**:115-121.
- Moreau JP, Eck CR, McCabe J and Skinner S (1986) [Absorption, distribution and elimination of a labelled extract of Ginkgo biloba leaves in the rat]. *Presse Med* **15**:1458-1461.
- Morrice PC, Wood SG and Duthie GG (2000) High-performance liquid chromatographic determination of quercetin and isorhamnetin in rat tissues using beta-glucuronidase and acid hydrolysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **738**:413-417.
- Naik SR, Pilgaonkar VW and Panda VS (2006) Evaluation of antioxidant activity of Ginkgo biloba phytosomes in rat brain. *Phytother Res* **20**:1013-1016.
- Nieder M (1991) [Pharmakokinetik der Ginkgo-Flavonole im Plasma]. *Medizin Verlag GmbH München* **133**:61-62.
- Nielsen SE and Dragsted LO (1998) Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for the determination of quercetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **707**:81-89.
- Nijveldt R, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K and van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM and Williamson G (2003) Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol* **65**:479-491.
- Oliveira EJ, Watson DG and Grant MH (2002) Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma. *Xenobiotica* **32**:279-287.

- 
- Paulke A, Nöldner M, Schubert-Zsilavec M and Wurglics M (2008) St. John's wort flavonoids and their metabolites show antidepressant activity and accumulate in brain after multiple oral doses. *Pharmazie* **63**:296-302.
- Paulke A, Schubert-Zsilavec M and Wurglics M (2006) Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **832**:109-113.
- Pietri S, Maurelli E, Drieu K and 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.
- Pietta PG, Gardana C and Mauri PL (1997) Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **693**:249-255.
- Pietta PG, Gardana C, Mauri PL, Maffei-Facino R and Carini M (1995) Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginkgo biloba extract. *J Chromatogr B Biomed Appl* **673**:75-80.
- Prehn JH and Kriegstein J (1993) Platelet-activating factor antagonists reduce excitotoxic damage in cultured neurons from embryonic chick telencephalon and protect the rat hippocampus and neocortex from ischemic injury in vivo. *J Neurosci Res* **34**:179-188.
- Rais I, Karas M and Schagger H (2004) Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* **4**:2567-2571.
- Ramassamy C (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* **545**:51-64.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R and Poirier J (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic Biol Med* **27**:544-553.
- Ramassamy C, Christen Y, Clostre F and Costentin J (1992) The Ginkgo biloba extract, EGb 761, increases synaptosomal uptake of 5-hydroxytryptamine: in-vitro and ex-vivo studies. *J Pharm Pharmacol* **44**:943-945.
- Ramassamy C, Longpre F and Christen Y (2007a) Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer's disease: is there any evidence? *Curr Alzheimer Res* **4**:253-262.
- Ramassamy C, Longpre F and Christen Y (2007b) Ginkgo biloba Extract (EGb 761) in Alzheimer's Disease: Is there any evidence? *Current Alzheimer Research* **4**:253-262.
- Reinhard E (2001) *Pharmazeutische Biologie. Die biologische Grundlagen für Studium und Praxis*  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Rimpler H (1999) *Biogene Arzneistoffe*. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart.
-

- 
- Rote Liste Service G ed (2007) *Rote Liste* Rote Liste Service, GmbH, Frankfurt am Main.
- Schägger H (2003) Blue Native Electrophoresis, in *Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide* (Hunte C, von Jagow G and Schrägger H eds) pp 105-130, Academic Press, USA.
- Schägger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* **1**:16-22.
- Schägger H, Cramer WA and von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**:220-230.
- Schägger H, Link TA, Engel WD and von Jagow G (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc1 complex from beef heart. *Methods Enzymol* **126**:224-237.
- Schägger H and von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**:223-231.
- Schulz V and Hänsel R (2004) *Rationale Phytotherapie. Ratgeber für Ärzte und Apotheker*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Schwabe U and Pfaffrath D eds (2008) *Atzneimittelverordnungs-Report 2007*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT and Yacobi A (2000) Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* **17**:1551-1557.
- Shali NA, Curtis CG, Powell GM and Roy AB (1991) Sulphation of the flavonoids quercetin and catechin by rat liver. *Xenobiotica* **21**:881-893.
- Sharma HS, Drieu K, Alm P and Westman J (2000) Role of nitric oxide in blood-brain barrier permeability, brain edema and cell damage following hyperthermic brain injury. An experimental study using EGB-761 and Ginkgolide B pretreatment in the rat. *Acta Neurochir Suppl* **76**:81-86.
- Shinozuka K, Umegaki K, Kubota Y, Tanaka N, Mizuno H, Yamauchi J, Nakamura K and Kunitomo M (2002) Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. *Life Sci* **70**:2783-2792.
- Siegers CP (1999) Cytotoxicity of alkylphenols from Ginkgo biloba. *Phytomedicine* **6**:281-283.
- Sierpina VS, Wollschlaeger B and Blumenthal M (2003) Ginkgo biloba. *Am Fam Physician* **68**:923-926.
- Sitte P, Weiler E, W., Kadereit J, W., Bresinsky A and Körner C (2002) *Strasburger Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin.
- Smith JV and Luo Y (2004) Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:465-472.
-

- Smith PF, MacLennan K and Darlington CL (1996) The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol* **50**:131-139.
- Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK and Rice-Evans C (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* **458**:224-230.
- Spencer JP, Kuhnle GG, Williams RJ and Rice-Evans C (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J* **372**:173-181.
- Spolarich AE and Andrews L (2007) An examination of the bleeding complications associated with herbal supplements, antiplatelet and anticoagulant medications. *J Dent Hyg* **81**:67.
- Sticher O (1992) Ginkgo biloba--Analytik und Zubereitungsformen. *Pharmazie in unserer Zeit* **6**:253-265.
- Strasburger E, Noll F, Schenck H and Schimper AFW (1983) *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Stromgaard K and Nakanishi K (2004) Chemistry and biology of terpene trilactones from Ginkgo biloba. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**:1640-1658.
- Stromgaard K, Saito DR, Shindou H, Ishii S, Shimizu T and Nakanishi K (2002) Ginkgolide derivatives for photolabeling studies: preparation and pharmacological evaluation. *J Med Chem* **45**:4038-4046.
- Suzuki H (1962) Hydrolysis of flavonoid glycosides by enzymes (rhamnodiastase from Rhamnus and other sources. *Arch Biochem Biophys* **99**:476-483.
- Tang Y, Lou F, Wang J, Li Y and Zhuang S (2001) Coumaroyl flavonol glycosides from the leaves of Ginkgo biloba. *Phytochemistry* **58**:1251-1256.
- Tendi EA, Bosetti F, Dasgupta SF, Stella AM, Drieu K and Rapoport SI (2002) Ginkgo biloba extracts EGb 761 and bilobalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells. *Neurochem Res* **27**:319-323.
- Umegaki K, Saito K, Kubota Y, Sanada H, Yamada K and Shinozuka K (2002) Ginkgo biloba extract markedly induces pentoxifyresorufin O-dealkylase activity in rats. *Jpn J Pharmacol* **90**:345-351.
- Umegaki K, Taki Y, Endoh K, Taku K, Tanabe H, Shinozuka K and Sugiyama T (2007) Bilobalide in Ginkgo biloba extract is a major substance inducing hepatic CYPs. *J Pharm Pharmacol* **59**:871-877.
- Vafeiadou K, Vauzour D and Spencer JP (2007) Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **7**:211-224.
- Vellas B, Andrieu S, Ousset PJ, Ouzid M and Mathieux-Fortunet H (2006) The Ginkgo study: methodological issues. A 5-year double-blind randomized trial of the efficacy of EGb 761 for prevention of Alzheimer disease in patients over 70 with a memory complaint. *Neurology* **67**:S6-11.

- Vogensen SB, Stromgaard K, Shindou H, Jaracz S, Suehiro M, Ishii S, Shimizu T and Nakanishi K (2003) Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives: potent platelet activating factor (PAF) receptor antagonists. *J Med Chem* **46**:601-608.
- Wada K, Sasaki K, Miura K, Yagi M, Kubota Y, Matsumoto T and Haga M (1993) Isolation of bilobalide and ginkgolide A from *Ginkgo biloba* L. shorten the sleeping time induced in mice by anesthetics. *Biol Pharm Bull* **16**:210-212.
- Walker JE, Lutter R, Dupuis A and Runswick MJ (1991) Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **30**:5369-5378.
- Wang L and Morris ME (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectroscopy assay for quercetin and conjugated quercetin metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **821**:194-201.
- Watanabe CM, Wolfram S, Ader P, Rimbach G, Packer L, Maguire JJ, Schultz PG and Gohil K (2001) The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine ginkgo biloba. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:6577-6580.
- Watson DG and Oliveira EJ (1999) Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of *Ginkgo biloba* tablets. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **723**:203-210.
- Watson DG and Pitt AR (1998) Analysis of flavonoids in tablets and urine by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **12**:153-156.
- Westendorf J and Regan J (2000) Induction of DNA strand-breaks in primary rat hepatocytes by ginkgolic acids. *Pharmazie* **55**:864-865.
- Williamson G and Manach C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* **81**:243S-255S.
- Wittig I, Braun HP and Schägger H (2006) Blue Native PAGE. *Nature Protocols* **1**:418-428.
- Wittig I, Carrozzo R, Santorelli FM and Schägger H (2007a) Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* **28**:3811-3820.
- Wittig I, Karas M and Schägger H (2007b) High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* **6**:1215-1225.
- Wojcicki J, Gawronska-Szklarz B, Bieganowski W, Patalan M, Smulski HK, Samochowiec L and Zakrzewski J (1995) Comparative pharmacokinetics and bioavailability of flavonoid glycosides of *Ginkgo biloba* after a single oral administration of three formulations to healthy volunteers. *Mater Med Pol* **27**:141-146.
- Wolfram S, Block M and Ader P (2002) Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* **132**:630-635.
- Wu Y, Li S, Cui W, Zu X, Wang F and Du J (2007) *Ginkgo biloba* extract improves coronary blood flow in patients with coronary artery disease: role of endothelium-dependent vasodilation. *Planta Med* **73**:624-628.

- Xie J, Ding C, Ge Q, Zhou Z and Zhi X (2008) Simultaneous determination of ginkgolides A, B, C and bilobalide in plasma by LC-MS/MS and its application to the pharmacokinetic study of Ginkgo biloba extract in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **864**:87-94.
- Xin W, Wei T, Chen C, Ni Y, Zhao B and Hou J (2000) Mechanisms of apoptosis in rat cerebellar granule cells induced by hydroxyl radicals and the effects of EGb 761 and its constituents. *Toxicology* **148**:103-110.
- Zalewska T, Zablocka B and Domanska-Janik K (1996) Changes of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase-II after transient ischemia in gerbil hippocampus. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **56**:41-48.
- Zerbetto E, Vergani L and Dabbeni-Sala F (1997) Quantification of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18**:2059-2064.
- Zimmermann M, Colciaghi F, Cattabeni F and Di Luca M (2002) Ginkgo biloba extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **48**:613-623.

---

**LEBENS LAUF**
**Persönliche Angaben**

Name: Laura Rangel-Ordóñez  
 Geburtsdatum: 25 September 1974  
 Geburtsort: Apan, Hidalgo, Mexico  
 Staatsangehörigkeit: Mexikanisch  
 Eltern: Gloria Ordóñez y Medina  
 Rodolfo Rangel Quintos<sup>‡</sup>

**Studium**

- 
- Apr 05 – **Promotion am Institut für pharmazeutische Chemie**  
 J. W. Goethe Universität, Frankfurt am Main.  
*Dissertationsthema unter der Leitung von Prof. Schubert-Zsilavecz:*  
*Ginkgo biloba:* Untersuchungen zur HPLC-Bioanalytik und ZNS-Bioverfügbarkeit von Flavonoiden und zur Expression der Atmungskettenproteine durch EGb 761 an Ratten.  
 Forschungsprojekt mit der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel in Kooperation mit Prof. Karas und Prof. Schägger.
- Aug 98 – Jul 02 **Master of Science in analytischer Chemie**  
 Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexiko-Stadt.  
*Dissertationsthema unter der Leitung von Prof. Luz-Elena Vera-Avila:*  
 Studie spezifischer Phenylharnstoff-Immunsorbenten und Entwicklung sowie Validierung einer HPLC-Methode mit Festphasenextraktion für die Analyse von Phenylharnstoff-Herbiziden.
- Okt 92 – Dez 97 **Diplom-Studium in biologischer und pharmazeutischer Chemie**  
 Universidad Autónoma de México (UNAM), Mexiko-Stadt.  
*Dissertationsthema unter der Leitung von Prof. Octavio Reyes-Salas:*  
 Elektrochemie als Qualitätskontrollmethode von pflanzlichen Arzneimitteln - *Arnica Montana*.

**Schulbildung**

- 
- Sep 89 – Jul 92 **Gymnasium**  
 Preparatoria Federal por Coop. Lic. Benito Juarez, Apan, Hidalgo, Mexiko.
- Sep 86 – Jun 89 **Sekundarschule**  
 Secundaria Federal Miguel Hidalgo, Apan, Hidalgo, Mexiko.
- Sep 80 – Jun 86 **Grundschule**  
 Primaria Manuel Sabino Crespo, Apan, Hidalgo, Mexiko.  
 Primaria Benito Juarez, Apan, Hidalgo, Mexiko.  
 Primaria Colegio Plancarte, Apan, Hidalgo, Mexiko.

---

**Wissenschaftlicher Werdegang**

---

- Okt 03 – Apr 04      **Forschungsaufenthalt im Bereich Analytik**  
Michigan State University, Institute of Biochemistry.  
*Forschungsprojekt unter der Leitung von Prof. Jack Trock Watson:*  
Analytische Methoden für die Studie von Biomolekülen basiert auf Massenspektrometrie. Optimierung einer Methode für die Analyse von Isoformen der RNAase-A.
- Aug 02 – Aug 03      **Wissenschaftliche Angestellte/Dozentin (Vollzeit)**  
Universidad Autónoma de Yucatán, Fakultät für Chemie, Mexiko.  
Durchführung von Elektrochemie-Projekten für die Umweltanalyse, Betreuung von Diplomstudenten sowie Leitung und Organisation der Veranstaltungen:
- Vorlesung für fortgeschrittene chemische Gleichgewichte (Simultangleichgewichte) für Magisterstudenten.
  - Vorbereitungskurs für die Bewerber für Diplom- und Doktorarbeiten.
  - Vorlesungen/Praktikum des Faches “Instrumental Analytik I und II” für Chemiestudenten im 4. und 5. Semester.
- Sep 98 – Jul 02      **Dozentin (Teilzeit)**  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Fakultät für Chemie.  
Leitung und Organisation des Praktikums “Chemische Equilibrium“ und „Quantitative Analyse durch Potentiometrie und UV/VIS-Spektroskopie“ für Chemie- und Pharmaziestudenten im 3. Semester.
- Sep 96 – Jul 98      **Studentische Lehrkraft (Teilzeit)**  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Fakultät für Chemie.  
Assistentin in den Fächern “Analytische Chemie” und “Allgemeine Chemie” für Studenten des 1. bzw. 3. Semesters.

---

**Praktika**

---

- Jun 97 – Sep 97      **Praktikum**  
Mexican Petroleum Institute (IMP), Katalyse-Abteilung. Stipendium des IMP  
*Forschungsprojekt:* Physicochemische Charakterisierung hydrierender Tonmaterialien für ihre Anwendung in der Umweltanalytik.
- Jan 97 – Jun 97      **Praktikum**  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Fakultät für Chemie.  
*Forschungsprojekt:* Analytische Studie und Bestimmung von Metallionen durch elektrochemischen Methoden und ihre Verwendung in der Umweltanalytik.

**Präsentationen von Postern im Rahmen der Doktorarbeit**

---

- Apr 07 **Study of the bioavailability of Ginkgo flavonoids in rats**  
Pharmaceutical Science World Conference (DPhG), Amsterdam.  
L.Rangel-Ordóñez, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics.
- Okt 07 **ZNS-Verteilung von Flavonoid-Metaboliten in Ratten nach oraler Gabe von Ginkgo-biloba-Extrakt EGb 761®**  
German Pharmaceutical Society (DPhG) Join Meeting, Erlangen, Germany.  
L. Rangel-Ordóñez, M. Nöldner, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics.
- Okt 06 **Bioavailability of Ginkgo flavonoids after single dose of ginkgo biloba extract**  
German Pharmaceutical Society (DPhG) Join Meeting, Marburg, Germany.  
L. Rangel-Ordóñez, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics.
- Sep 06 **HPLC-Fluoreszenz Methode zur Bestimmung von Ginkgo biloba Flavonoiden im Rattenhirn**  
Graduate Students Meeting, Nürnberg, Germany.  
L. Rangel-Ordóñez, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics.

**Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit**

---

Rangel-Ordóñez L, Nöldner M, Schubert-Zsilavec M and Wurglics M (2008) Bioavailability of flavonoids in rat brain and plasma after single and repeated doses of standardized Ginkgo biloba Extrakt EGb 761. *J Pharmacol Exp Ther.* submitted

**Andere Publikationen**

---

- Gallegos-Perez JL, Rangel-Ordóñez L, Bowman SR, Ngowe CO and Watson JT (2005) Study of primary amines for nucleophilic cleavage of cyanylated cystinyl proteins in disulfide mass mapping methodology. *Anal Biochem* 346:311-319.
- Vera-Avila LE, Rangel-Ordóñez L and Covarrubias-Herrera R (2003) Evaluation and characterization of a commercial immunosorbent cartridge for the solid-phase extraction of phenylureas from aqueous matrices. *J Chromatogr Sci* 41:480-488.
- Reyes-Salas EO, Rangel-Ordóñez L, Manzanilla-Cano JA, Barcelo-Quintal MH and Dosal Gomez MA (2002) Voltammetric Determination of caffeic acid in *Arnica montana*. *Analytical Letters* 35:971-984.

**DANKSAGUNG**

*„Man kann einen Menschen nichts lehren,  
man kann ihm nur helfen, es in sich selbst zu entdecken“  
Galileo Galilei*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2005 bis April 2008 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz angefertigt.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herr Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die Annahme in seinem Arbeitskreis bedanken, für das Vertrauen bei der Überlassung des faszinierenden Themas, und dafür das er mir die Möglichkeit gegeben hat, im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel, meine Dissertation anzufertigen. Weiterhin bedanke ich mich für die guten Arbeitsbedingungen und für die Unterstützung bei der Teilnahme an mehreren wissenschaftlichen Veranstaltungen bzw. Weiterbildungskursen. Ferner möchte ich mich bei ihm für die Begutachtung meiner Forschungsarbeit vor dem DAAD bedanken.

Ein besonderes herzliches Dankeschön möchte ich meinem freundlichen Betreuer Dr. Mario Wurglics widmen, der mir bereits vor Beginn meines Aufenthaltes in Deutschland bei der Erledigung zahlloser Formalitäten geholfen und Orientierung verschafft hat. Zudem möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass er meine Arbeit kritisch und geduldig betreut und mit zahlreichen Fragestellungen angereichert hat. Die unzähligen Diskussionen haben mich „gezwungen“, meine Arbeit selbstkritisch und gleichzeitig selbstsicher in Angriff zu nehmen. Alles im Allem hat mir er mir geholfen, meine wissenschaftlichen Fähigkeiten weiter zu entwickeln.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) verpflichtet mich ein besonderes Dankeschön für die Verleihung eines Stipendiums, das mir einen Forschungsaufenthalt in Deutschland ermöglicht hat. Weiterhin bin ich dankbar für die Förderung zum Erlernen der deutschen Sprache, was dazu geführt hat, dass ich mich in Deutschland nicht fremd gefühlt habe, und mich dazu ermuntert hat, meine Dissertation in Deutsch zu verfassen. Besonders Frau Hilde Mönch spreche ich meinen innigsten Dank aus, für ihre stets kompetente Orientierung und freundliche Begleitung durch meinen ganzen Forschungsaufenthalt.

Desweiteren möchte ich Herr Prof. Michael Karas und Herr Prof. Hermann Schägger für die Kooperation und die freundliche Betreuung während des Teilprojekts „Proteomics“ danken, da sie mir hierbei die Möglichkeit gegeben haben, meine Kenntnisse über die Proteinanalyse weiter zu vertiefen. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Ilka Wittig bedanken, die mir geduldig die native Elektrophorese beigebracht hat, und für ihre freundliche und immerzu kompetente Betreuung, die mich trotz der Kürze des Aufenthaltes am Uni-Klinikum beindruckt hat.

Bei den Herren Prof. Theodor Dingermann, Prof. Michael Karas und Prof. Dieter Steinhilber bedanke ich mich für das Vertrauen und die Begutachtung meiner Arbeit vor dem DAAD.

Ebenfalls möchte ich mich bei der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit sowie der Bereitstellung des Gingkoextraktes bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Nöldner und seiner Mitarbeiterin Frau Beatrix Buchhalter, die eine echte Freundin geworden ist, für die kompetente wissenschaftliche Zusammenarbeit und für die freundliche und nette Gastfreundschaft während der Durchführung der Tieruntersuchungen, die in der Firma durchgeführt wurden.

Ich danke herzlich den Mitmenschen, die sich die Mühe gemacht haben, Teile meines Manuskriptes durchzusehen, und zu diskutieren. Mein Dank gilt vor allem meinen Kollegen Dr. Mario Wurglics, Dr. Ilka Wittig, Dr. Alexander Paulke sowie Christian Ude, die die verschiedenen Kapitel meine Arbeit gelesen und korrigiert haben und mir Verbesserungen vorgeschlagen haben. Weiterhin möchte ich mich bei Hanna und Reiner Klappich sowie bei Udo Wagner für ihre Hilfe bei der Korrektur der letzten gesamten Versionen bedanken.

Den ehemaligen und heutigen Mitarbeiter meines Arbeitskreises, namentlich Dr. Mona Abdel-Tawab, Dr. Oliver Rau, Dr. Alexander Paulke, Dr. Yvonne Syha, Laura Popescu, Jessica Zitkowsky, Phillip Krüger, Stephan Bihler, Heiko Zettl, Michaela Dietrich, Christian Ude, Theresa Thieme, Ramona Steri, Martina Hieke sowie Frau Felicitas Wonka und Astrid Winter, möchte ich für die Erfahrungen am Institut, für ihre fachliche Hilfsbereitschaft und Geduld bei den zahllosen sprachlichen Erklärungen wissenschaftlicher bzw. Alltagsbegriffe sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ein erfolgreicher Aufenthalt in Deutschland wäre ohne die Ermutigung und den Rückhalt von zahlreichen Personen einfach unmöglich gewesen, die mich unabhängig davon, ob in Deutschland, meiner Heimat Mexiko oder in den USA unterstützt und dafür gesorgt haben, dass das Heimweh keinen Platz in mir hatte. Besonders möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

Hanna, Reiner und Jojo Klappich, die mich im Schoß ihrer selbst ausgewählten, internationalen, freundlichen und interessanten Familie liebevoll aufgenommen haben. Für die Freude und bereichernden Ausflüge in die Welt der Kunst, Philosophie und Musik, sowie vor allem für das Abenteuer „Mensch“, das diese glückliche, „zufällige“, „einzige Nacht“ zurfolge hatte. Danke, dass sie eine Familie für mich in Deutschland geworden sind, mich entsprechen behandelt und mein Herz und meine Seele erweitert haben.

Meinem Lehrer und Vorbild, Dr. Octavio Reyes Salas, der mir der Weg in die Freiheit und die Selbstentwicklung gezeigt hat. Für die Liebe zur Wissenschaft und den Hunger auf die Wahrheit, die er in mir geweckt hat. Dafür, dass er mich in den Sprache der Menschen eingeführt hat, der mir nicht nur während meiner „Wanderjahre“ geholfen und die Türe für zahlreiche „Länder“ geöffnet hat.

Meinem Vertrauten Dr. Jose Luis Gallegos Pérez möchte ich danken, dass er, vor allem am Anfang meines Auslandsaufenthalts, stets hinter mir gestanden ist und mich moralisch und fachlich unterstützt hat. Dafür dass er mich durch schlaflose Nächte im Labor oder zu Hause begleitet hat. Für die sprachliche und fachliche Unterstützung in verschiedenen Teilen meiner Arbeit und die wachsende Freundschaft, die sich durch die Überwindung starker Stürme langsam aber tief entwickelt hat.

Meinen zahlreichen Freunden in Mexiko, Deutschland und in der ganzen Welt, deren Freundschaft mich ermutigt und mir in schwierigen Zeiten geholfen hat. U.a. möchte ich meine „paisanos“ Octavio, Angela und Alfred Traue nennen, mit denen ich die Sehnsucht nach Mexiko geteilt habe. Miguel, Reem, Hilda, Omar, Tomabu, Xinrong, Telli, Shang-Ray, kleine Vahn, Erick und Desiree, alle die „Bulla“-Macher bei den Klappich, Seigo, Jin (der mein echter Vertrauter und mein „Nakamura Sensei“ geworden ist), Pam, u.v.a. die ich in wenigen Zeilen nicht umfassen kann, aber mir ein Vorbild dafür sind, dass man auch das Unmögliche erreichen kann.

Ein großes Dankeschön gilt auch den Angehörigen meiner Familie in Mexiko und den USA, die mich in meinen Entscheidungen stets unterstützt und durch moralische Kraft aufrecht erhalten haben. Besonders möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die mich sogar in für sie schweren Zeiten ermutigt und meine Abwesenheit bei Notfallsituationen liebevoll entschuldigt und meine Arbeit in Deutschland ermutigt hat. Die ein wichtiger Antrieb für mich gewesen ist, der mich darin bestärkt hat, von meinem Aufenthalt in Deutschland so viel wie möglich mitzunehmen, damit sich die Abwesenheit von meiner Familie auch gelohnt hat.

Meinen abschließenden Dank möchte ich meinem Freund Udo Wagner widmen, der stets an mich als eine „naranja completa“ geglaubt und unterstützt hat. Er hat, auch ohne fachliche Kenntnisse, nicht nur Teile der Arbeit noch im Rohzustand gelesen, sondern bis zur letzten Fassung der Dissertation immer wieder Zeile für Zeile unermüdlich und liebevoll gelesen und sprachlich korrigierte. Danke für die „abracito“-Pausen und für die seelische und materielle „Fütterung“, die mich während der harten nächtlichen Arbeitsstunden gekräftigt haben. Da sein Rückhalt, der mit Dank nicht aufzuwiegen ist, sich nur in der tiefen und grenzenloser Liebe seiner Wurzel befindet kann.

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

*Ginkgo biloba*

**Untersuchungen zur Bioanalytik und ZNS-Bioverfügbarkeit von Flavonoiden  
und zur Expression der Atmungskettenkomplexen durch EGb 761 an Ratten**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 5. Mai 2008

Laura Rangel-Ordóñez