



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

## GLUCURONIDIERUNG VON HONOKIOL IN DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Nicole Wagner
Matrikel-Nummer:	0002813
Studienrichtung:	Pharmazie (A-449)
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger

Wien, am 12. August 2008



## **DANKSAGUNG**

Die vorliegende Diplomarbeit entstand in dem Zeitraum von Oktober 2007 bis März 2008 am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik. Meine Arbeit hätte nicht in dieser Form entstehen können ohne die Mithilfe und Unterstützung zahlreicher Mitmenschen, bei denen ich mich hiermit ganz herzlich bedanken möchte!

Als erstes möchte ich Herrn Univ. Prof. Dr. Walter Jäger danken, da er mir die Durchführung dieser Diplomarbeit ermöglichte und an den ich mich jederzeit bei anstehenden Fragen und Problemen wenden konnte.

Weiters möchte ich mich bei Mag. Michaela Miksits bedanken. Sie stand mir, wann immer ich Anleitung bedurfte, mit Rat und Tat zur Seite.

Besonderer Dank gebührt jedoch meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle und persönliche Unterstützung dieses Studium überhaupt ermöglicht haben.

Zudem danke ich meinem Freund, der mich moralisch und fachlich unterstützt hat und in jeder Hinsicht für mich da war.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen Studienkollegen und Freunden bedanken, die mich während der gesamten Studienzeit begleitet haben.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Magnolia Officinalis</b> .....	<b>2</b>
2.1.1	Allgemein.....	2
2.1.2	Metabolismus .....	4
2.1.3	Pharmakologische Wirkungen.....	8
2.1.3.1	Anxiolytische Wirkung .....	8
2.1.3.2	Neuroprotektive Wirkung.....	11
2.1.3.3	Antiinflammatorische und antibakterielle Wirkung.....	12
2.1.3.4	Antitumorwirkung.....	14
2.1.3.5	Thrombozytenaggregationshemmung.....	15
2.1.3.6	Antimikrobielle Aktivität.....	15
<b>2.2</b>	<b>Biotransformation</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Phase-1-Reaktionen.....	17
2.2.2	Phase-2-Reaktionen.....	17
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.3.1	Die isoliert perfundierte Rattenleber .....	20
3.3.2	HPLC-System.....	23
3.3.3	Strukturaufklärung der Metabolite von Honokiol.....	24
3.3.4	Leberextraktion.....	25
3.3.5	Auswertung und Statistische Methoden .....	26

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>28</b>
4.1	<b>Trennung und Quantifizierung von Honokiol und dessen Biotransformationsprodukte mittels HPLC .....</b>	<b>28</b>
4.2	<b>Strukturaufklärung der Biotransformationsprodukte .....</b>	<b>32</b>
4.2.1	Enzymatische Hydrolyse .....	32
4.2.2	Massenspektrometrie (LC/MS) .....	32
4.3	<b>Metabolismus von Honokiol in der isolierten perfundierten Rattenleber .....</b>	<b>34</b>
4.3.1	Einfluß von Honokiol auf den Gallefluß .....	34
4.3.2	Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite in die Galle .....	36
4.3.3	Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite ins Perfusat .....	40
4.3.4	Kumulative biliäre Sekretion von Honokiol und dessen Metabolite in der Galle .....	45
4.3.5	Kumulative biliäre Sekretion von Honokiol und dessen Metabolite im Perfusat .....	46
4.4	<b>Prozentuelle Verteilung der Metabolite in Galle und Perfusat.....</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>75</b>

# 1 PROBLEMSTELLUNG

Die Rinde von *Magnolia Officinalis* wird bereits seit über 2000 Jahren in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt. In China ist die Arzneipflanze unter dem Namen Houpo bekannt und ihr werden eine Reihe verschiedener Wirkungen zugeschrieben. Honokiol ist einer der bedeutendsten Inhaltsstoffe von *Magnolia Officinalis*, aufgrund seiner vielfältigen pharmakologischen Wirkungen, wobei die anxiolytische Wirkung von größtem Interesse ist. Verabreicht wird die Arzneipflanze in Form eines Decoct. Dafür wird die Rinde mit heißem Wasser übergossen und als Tee getrunken. Die Rinde wird jedoch nicht nur alleine eingenommen, sondern sie kann auch innerhalb einer Rezeptur zusammen mit anderen Arzneipflanzen verabreicht werden, wie etwa in der Kampo-Medizin. Wichtige Verordnungen der Kampo-Medizin sind vor allem Saiboku-to oder Hangekoboku-to.

In der westlichen Welt erfolgte die erstmalige Isolierung von Honokiol aus *Magnolia Officinalis* in den 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts. Die Isolierung pflanzlicher Wirkstoffe gewinnt heutzutage immer mehr an Bedeutung, da synthetisch hergestellte Arzneimittel oft unerwünschte Nebenwirkungen und Wechselwirkungen aufweisen. Um diese Nebenwirkungen einzuschränken, gilt es neue therapeutische Methoden, basierend auf pflanzlichen Inhaltsstoffen, wie Honokiol, zu entwickeln.

Für eine zukünftige therapeutische Anwendung von Honokiol ist es wichtig Kenntnisse über die Wirksamkeit im Körper zu erlangen. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit der Metabolismus von Honokiol, der bisher weder In-vitro noch In-vivo untersucht wurde, anhand eines isolierten Leberperfusionsmodells der Ratte untersucht werden. Mittels HPLC-Analyse sollten die Biotransformationsprodukte im Perfusionsmedium und in der Galle erfasst und mit Hilfe von Sulfatase und  $\beta$ -Glucuronidase bestimmt werden, ob und in welchem Ausmaß diese Biotransformationsprodukte als Sulfate und/oder Glukuronide vorliegen. Die Bestimmung der Struktur dieser Biotransformationsprodukte sollte anschließend durch massenspektroskopische Methoden erfolgen.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 *Magnolia Officinalis*

#### 2.1.1 Allgemein

Die Pflanze *Magnolia Officinalis* ist eine von ungefähr 220 Arten der Gattung *Magnolia*, aus der Familie der Magnoliengewächse (Magnoliaceae). Magnolien sind Sträucher oder Bäume, und sommer- oder immergrün. Beheimatet sind sie in Ostasien und Nordamerika. Die Gattung Magnolie wurde nach dem französischen Botaniker Pierre Magnol benannt. Viele von ihnen zählen zu den prächtigsten Gehölzen und verbreiten einen traumhaften Duft. [1]



Abbildung 1: *Magnolia Officinalis* ([www.itmonline.org/image/mag1.jpg](http://www.itmonline.org/image/mag1.jpg))

Extrakte aus der Rinde von *Magnolia Officinalis* und anderen *Magnolia*- Arten werden bereits seit über 2000 Jahren in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt. Die Familie der Magnoliaceae zählt entwicklungsgeschichtlich zu den ältesten Pflanzen der Erde. Der chinesische Name dieser Arzneipflanze lautet

Houpo. [1] In der TCM werden Magnolia-Arten bevorzugt bei gastrointestinalen Beschwerden, Erkrankungen des Respirationstrakts und neurologischen Störungen [2] sowie als mildes Schlaf- und Beruhigungsmittel eingesetzt. [3] In Korea findet die Pflanze Verwendung bei der Behandlung von Diabetes und diabetischer Komplikationen. [4]

Die wohl bedeutendsten Inhaltsstoffe von *Magnolia officinalis* sind die beiden Neolignan-Isomere Honokiol und Magnolol. Sie sind vor allem in der Rinde zu finden. Die getrocknete Rinde von *Magnolia officinalis* enthält zwischen 1% und 5% Honokiol. Magnolol ist in der Konzentration zwischen 2% und 10% vorhanden. [2] Über eine Isolierung der Inhaltsstoffe wurde erstmals 1973 berichtet. [5] Neben den beiden Inhaltsstoffen wurden weiters ätherisches Öl, Alkaloide und Phenylpropanoide in der Rinde gefunden. [6]

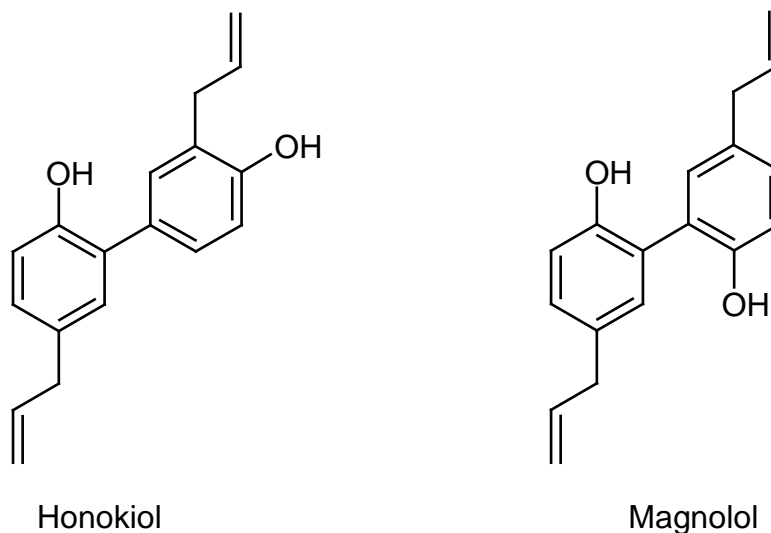


Abbildung 2: Strukturen der bedeutendsten Inhaltsstoffe von *Magnolia officinalis*

In der Traditionellen Chinesischen Medizin wird die Arznei in Form eines Decoct angewandt. [6] Das bedeutet, die Rinde wird mit heißem Wasser übergossen und als Tee getrunken. Jedoch ist der Geschmack nicht wohlschmeckend, er ist ziemlich bitter. [7]



Abbildung 3: Magnolia Officinalis ([www.aertsparadijs.be/specials/01.jpg](http://www.aertsparadijs.be/specials/01.jpg))

Die Magnolienrinde wird aber nicht nur alleine eingenommen, sondern auch innerhalb einer Rezeptur zusammen mit anderen Drogen, wie es in der Kampo-Medizin der Fall ist. Die Kampo-Medizin ist bisher bei uns in Europa noch wenig bekannt. Dabei handelt es sich um eine chinesisch-japanische Arzneimitteltherapie mit Heilpflanzen. Wichtige Verordnungen der Kampo-Medizin, welche Magnoliarinde enthalten, sind zum Beispiel Hangekoboku-to oder Saiboku-to. Diesen werden eine Reihe verschiedener Wirkungen nachgesagt und sie werden unter anderem bei Angstzuständen, gastrointestinalen Beschwerden, Asthma, Appetitlosigkeit, Schlaflosigkeit und Husten verabreicht. [1]

### **2.1.2 Metabolismus**

Der Metabolismus von Honokiol sowie dessen Biotransformationsprodukte wurden bis dato noch nicht geklärt. Hingegen gibt es von Magnolol, einer strukturverwandten Verbindung von Honokiol, schon genügend Daten.

Um den Metabolismus von Magnolol zu untersuchen, führten Hattori und seine Mitarbeiter Versuche mit Ratten durch. [8] Hierfür wurde den Ratten wiederholt Magnolol peroral verabreicht und nach 24 Stunden erste Urin- und Fäzesproben einer HPLC-Analyse unterzogen. Die Ergebnisse zeigten, dass 6 Metabolite im Fäzes gefunden wurden (M1, M2, M3, M4, M5, M6). Metabolit M1 und M6 wurden

als Hauptmetabolite detektiert. M6 zeigte die selbe Retentionszeit wie das native Magnolol und M1 stellte als Tetrahydromagnolol den zweiten Hauptmetaboliten dar. M2 und M3 waren Dihydro- Derivate von Magnolol. Die Strukturen von M4 und M5 konnten nicht vollständig aufgeklärt werden, jedoch stellen sie Isomere von Magnolol dar. [8]

Um die Rolle der intestinalen Bakterien am Metabolismus von Magnolol zu erläutern, wurde Magnolol mit frischem Fäzes inkubiert. Die nachfolgende Auswertung ergab, dass die Metabolite M2- M6, wie auch zuvor in den Urin- und Fäzesproben, gefunden wurden. Jedoch fehlte einer der Hauptmetaboliten, M1. Dies führte zu der Vermutung, dass die intestinalen Bakterien an der Isomerisierung von Magnolol teilnehmen, aber nicht an dessen Reduzierung. [8]

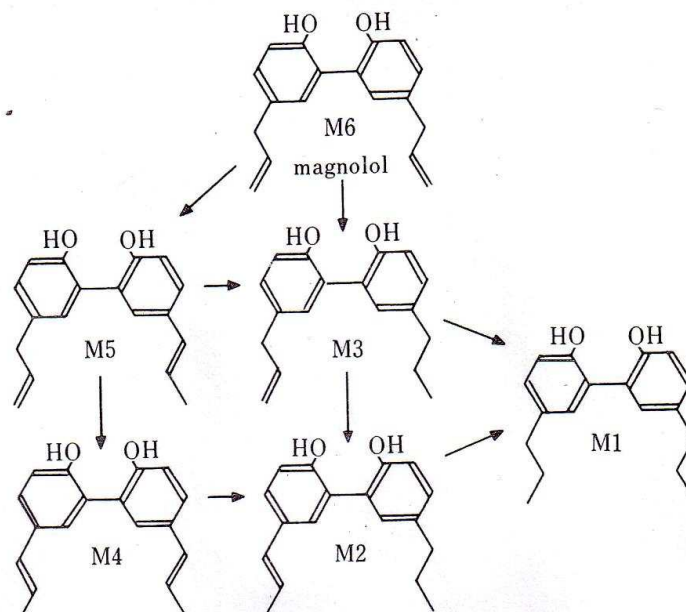


Abbildung 4: Strukturformeln der Umwandlungsprodukte von Magnolol: Tetrahydromagnolol (M1), 5-(1-propen-1(E)-yl)-5'-propyl-2,2'-dihydroxybiphenyl (M2), 5-allyl-5'-propyl-2,2'-dihydroxybiphenyl (M3), Isomagnolol (M4), 5-allyl-5'-(1-propen-1(E)-yl)-2,2'-dihydroxybiphenyl (M5), Magnolol (M6) [8]

Magnolol (M6) wird über die Zwischenstufe 5-allyl-5'-(1-propen-1(E)-yl)-2,2'-dihydroxybiphenyl (M5) zu Isomagnolol (M4) isomerisiert. Diese Isomere sowie das Magnolol selbst werden anschließend teilweise oder vollständig zu Dihydro- (M2, M3) und Tetrahydroderivaten (M1) reduziert. [8]

Hattori und seine Mitarbeiter verabreichten weiters radioaktiv markiertes Magnolol, welches ebenso peroral aber auch intraperitoneal appliziert wurde. [9]

Die Radioaktivität im Blut erreichte ein erstes Maximum nach 15 Minuten, was auf eine rasche Aufnahme des Magnolols hinwies. Die Blutradoaktivitätswerte sanken danach ab, um nach 4 Stunden erneut anzusteigen und ein weiteres Maximum nach 8 Stunden zu erreichen. Dies lässt auf einen Enterohepatischen Zyklus von Magnolol und seinen Metaboliten schließen. Die Untersuchung der Zusammensetzung der radioaktiven Komponenten im Blut ergab 10 % Magnolol und 16 % Magnolol-2-O-Glucuronide. [9]

Peroral verabreichtes radioaktiv markiertes Magnolol wurde binnen 24 Stunden zu 65 % im Fäzes und zu 11 % im Urin ausgeschieden. Bei intraperitonealer Verabreichung erfolgte die Ausscheidung in geringeren Mengen. Im Fäzes lagen die Biotransformationsprodukte zu 53 % in freier Form und nur zu 6 % als Glucuronide und Sulfate vor. Im Urin waren die freien Formen zu einem wesentlich geringeren Prozentanteil zu finden, jedoch waren die Glucuronide und Sulfate wieder nur mit 6 % vertreten. Eine Untersuchung der Gallensekrete ergab jedoch, dass 48-49 % der ausgeschiedenen radioaktiv markierten Verbindungen Glucuronide waren, während die freie Form und ihre Metabolite nur 7 % ausmachten. Basierend auf diesen Daten zogen Hattori und seine Mitarbeiter den Schluss, dass die Konjugate die hauptsächlich über die Galle ausgeschieden werden von der intestinalen Mikroflora zu ihrer freien Form hydrolisiert werden. [9]

Tsai und Mitarbeiter zeigten, dass die Glucuronidierung den Hauptmetabolisierungsweg für Magnolol darstellt. Nach oraler Gabe von 20 mg/kg Magnolol konnte mittels Herzpunktion Blut von männlichen Sprague Dawley Ratten gesammelt, mit  $\beta$ -Glucuronidase inkubiert und einer HPLC-Analyse zugeführt werden. Ein Anstieg der Peakfläche von Magnolol war die Folge und zeigte indirekt das Vorhandensein von Magnololglucuronoid auf. [10]

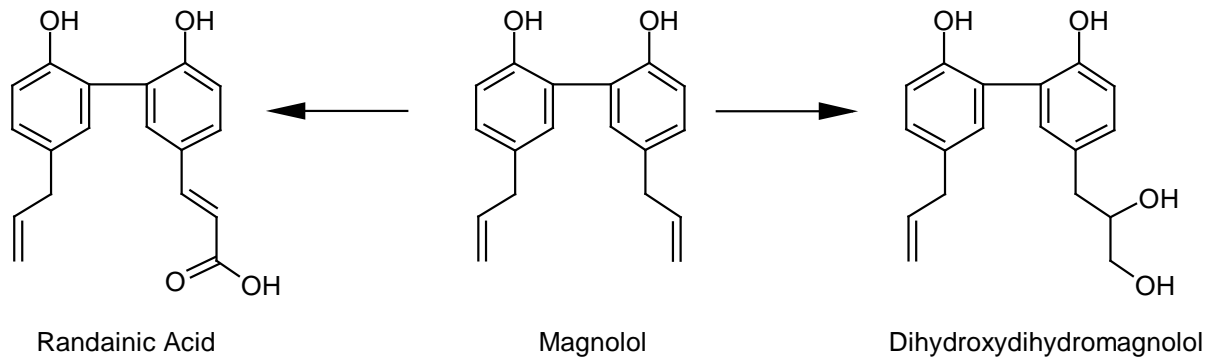


Abbildung 5: Metabolismus von Magnolol aus dem Wasserextrakt von *Magnolia Officinalis* [6]

Takahiro Nakazawa und seine Mitarbeiter beschäftigten sich in deren Studie mit der Aufklärung der aktiven Metabolite aus der Rinde von *Magnolia Officinalis*. Hierfür wurden einem Probanden und Ratten ein Wasserextrakt der Rinde verabreicht. Anschließend wurden Urinproben entnommen und mittels HPLC ausgewertet. [6]

Ratten wurde das Wasserextrakt mittels Magenintubation verabreicht und anschließend Urinproben in 12 Stundenintervallen, über eine Gesamtdauer von 48 Stunden, gesammelt. Der Proband bekam das Wasserextrakt oral verabreicht und dessen Urinproben wurden 24 Stunden nach Applikation gesammelt. Um den Ursprung der Metabolite zu verstehen, wurde eine qualitative und quantitative Untersuchung des Wasserextrakts von *Magnolia Officinalis* durchgeführt. Mittels HPLC-Analyse wurden fünf Substanzen im Wasserextrakt detektiert: Syringin, Magnolosid A, Magnolosid B, Honokiol und Magnolol. Im Urin des Probanden fand man vier Metabolite: Sinapic Acid, Randainic Acid, Magnolol und Dihydroxydihydromagnolol. Die Auswertung des Rattenurin ergab fünf Metabolite: Sinapic Acid-4-O-Sulfate, Sinapic Acid-4-O- $\beta$ -Glucuronide, Synapic Acid, 3-[2',6'-dihydroxy-5'-(2-propenyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl]-(E)-2-propenoic acid (Randainic Acid) und die unveränderte Form Magnolol. Außer Magnolol kam keine dieser Substanzen im ursprünglich verabreichten Wasserextrakt vor. Um herauszufinden aus welcher der im Wasserextrakt befindlichen Substanzen, diese im Urin gefundenen Metaboliten entstanden, bekamen weitere Ratten Syringin bzw. Magnolol alleine verabreicht. Der Urin wurde wie oben stehend beschrieben, gesammelt und untersucht. Bei Ratten die Syringin verabreicht bekommen hatten, wurden dabei Sinapic Acid-4-O-Sulfate, Sinapic Acid-4-O- $\beta$ -Glucuronide und Synapic Acid

gefunden. Takahiro Nakazawa und seine Mitarbeiter stellten daher die Vermutung auf, dass Syringin der Vorläufer für eben diese Metaboliten sei. Bei Ratten die Magnolol alleine verabreicht bekamen, wurde Randainic Acid und unmodifiziertes Magnolol im Urin festgestellt. Takahiro Nakazawa und seine Mitarbeiter stellten daher ebenfalls die Schlußfolgerung auf, dass Magnolol der Vorläufer für Randainic Acid sei. Bemerkenswert war, dass in der Urinprobe des humanen Probanden Dihydroxydihydromagnolol gefunden wurde, im Urin der Ratten jedoch nicht. [6]

Sinapic Acid, Randainic Acid, Magnolol und Dihydroxydihydromagnolol wurden einzeln Mäusen verabreicht und in einem *forced-swimming test* auf anxiolytische Wirkung getestet. Diese war nur bei Magnolol und Dihydroxydihydromagnolol feststellbar. [6]

### **2.1.3 Pharmakologische Wirkungen**

#### **2.1.3.1 Anxiolytische Wirkung**

Der anxiolytische Effekt von Honokiol wurde erstmals von Kuribara und Maruyama gemeinsam mit deren Mitarbeitern publiziert. [11] In diesen anfänglichen Studien wurden Tiermodellversuche durchgeführt, wie etwa der *Elevated plus-maze test* mit Mäusen, welcher eine standardisierte Messung des Angstlevels für Tiere erlaubt. Hierfür wurden den Mäusen 0,2-2 mg/kg Honokiol 7 Tage hindurch oral verabreicht, mit dem Resultat einer anxiolytischen Wirkung. Eine Singeldosierung von 20mg/kg hatte den selben Effekt. [11] Hattori und seine Mitarbeiter fanden heraus, dass eine tägliche Verabreichung von Magnolol, ein Isomer von Honokiol, gesteigerte Plasmalevel von partiell hydrierten Magnololderivaten hervorruft. Daher stellten er und seine Mitarbeiter die Hypothese auf, dass wiederholte Gabe von Honokiol zu einer Metabolitenakkumulation führen könnte. Der anxiolytische Effekt wäre demnach nicht auf Honokiol, sondern auf deren Biotransformationsprodukte zurückzuführen. [8, 9]

In früheren pharmakologischen Studien wurde herausgefunden, dass die Hydrierung der Propenylseitenkette den Hauptmetabolismusweg von Magnolol darstellt. Es

wurde deshalb erwartet, dass der Metabolismus von Honokiol auch reduzierte Derivate hervorbringt. [12]

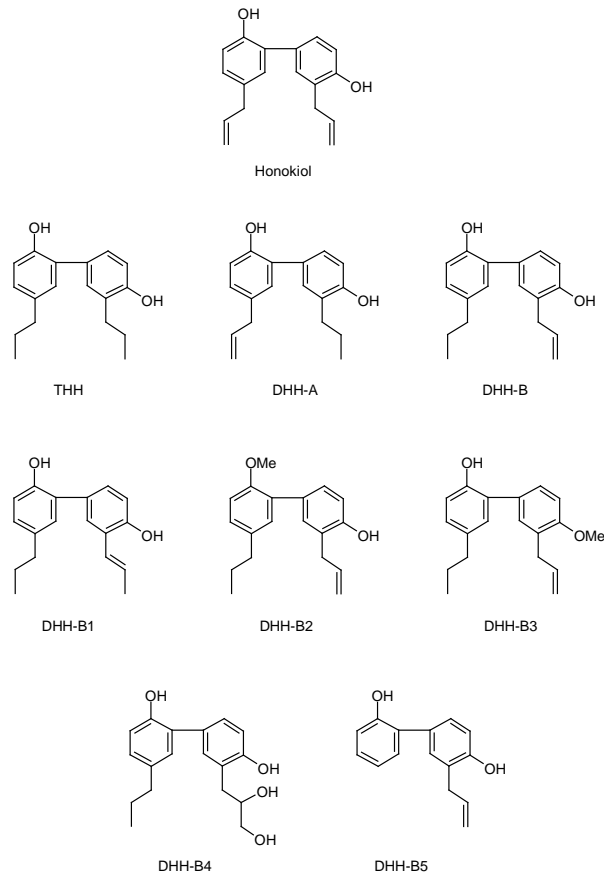


Abbildung 6: Honokiol- Analoga [13]

Um der chronischen Applikation von Honokiol entgegen zu können, untersuchten Kuribara und seine Mitarbeiter Analoga von Honokiol. Diese Analoga waren Tetrahydrohonokiol (THH), Dihydrohonokiol A (DHH-A) und Dihydrohonokiol-B (DHH-B). Jedoch zeigte THH und DHH-A keine Wirkung. DHH-B hingegen zeigte eine hervorragende anxiolytische Wirkung. Aus diesem Grund wurden weitere Analoga von DHH-B untersucht. Hierzu zählten DHH-B1-B5. Aber nur DHH-B3 zeigte eine anxiolytische Wirkung. Welche jedoch sehr schwach ausfiel. [13]

Biochemische In-vitro Untersuchungen wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob der starke anxiolytische Effekt von DHH-B durch den  $GABA_A$  Rezeptor-Chlorid-Ionenkanal-Komplex vermittelt wird. In diesem In-vitro Experiment wurde der Effekt von DHH-B auf die Chloridaufnahme in die kortikoiden Synaptoneurosomen der

Maus untersucht. Und zwar in Abwesenheit und Präsenz von Muscimol, ein GABA<sub>A</sub>-Agonist. [11] Die Resultate ergaben, dass DHH-B nicht nur die Chloridaufnahme stimuliert, sondern auch die Muscimol induzierte Chloridaufnahme erhöht. Es wird daher angenommen, dass der GABA<sub>A</sub>- Rezeptor gekoppelte Chlorid- Kanal-Komplex bei der anxiolytischen Wirkung von DHH-B involviert ist. [11] Oral verabreichtes Honokiol führte bei Ratten im *Elevated-plus-maze test* zu einer anxiolytischen Wirkung, welche auch durch Benzodiazepine, wie z.B Diazepam hervorgerufen wird. Kuribara und Maruyama sowie deren Mitarbeiter stellten daher die Vermutung auf, dass diese Wirkung über den selben Mechanismus vermittelt wird. [11] Bei Benzodiazepinen erfolgt dies durch Modulation der Bindungsstellen des Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ - Aminobuttersäure) am GABA<sub>A</sub>- Rezeptor, einem Chlorid- Ionenkanal. GABA ist der wichtigste Transmitter an hemmenden Synapsen und kommt in vielen Regionen des Zentralnervensystems vor. Die GABA<sub>A</sub>- Bindungsstellen sind Teilstrukturen von Chlorid- Kanälen, die durch GABA geöffnet werden. An diesen Kanalproteinen greifen Benzodiazepine an und verstärken die inhibitorische Wirkung. [14]

Die Studie von Kuribara und Maruyama gemeinsam mit deren Mitarbeitern zeigte, dass Honokiol keine motorischen Dysfunktionen verursacht. Es führt zu keiner Muskelrelaxierung oder Amnesie, wie etwa nach der Applikation mit Diazepam. [15] Dies läßt darauf schließen, dass Honokiol nicht die selben Nebenwirkungen besitzt. Es ist jedoch anzumerken, dass ein therapeutischer Effekt der Benzodiazepine der antikonvulsive Effekt ist. Bicuculline induzierter Tod, einhergehend mit tonischen und klonischen Krämpfen wird von Diazepam gehemmt, nicht aber von Honokiol. Daher scheint Honokiol gegen Krämpfe ineffektiv zu sein. [15]

Eine Kombination von Diazepam mit Dihydrohonokiol-B erhöht die anxiolytische Wirkung. [15]

Zusammenfassend ist anzumerken, dass die anxiolytische Aktivität von DHH-B anscheinend durch rezeptorgekoppelte Chloridkanäle, wie GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren, zustandekommt. Ferner sind noch Studien von Nöten, um die Bindungsorte bzw. Rezeptoren von DHH-B zu klären und den pharmakologischen Mechanismus zu erläutern. [15]

### **2.1.3.2 Neuroprotektive Wirkung**

Alzheimer ist eine über Jahre gleichmäßig langsam fortschreitende Demenz-Erkrankung des Gehirns, die vorwiegend im Alter auftritt und mit einer Abnahme der Hirnfunktionen einhergeht. Die Krankheit beginnt mit geringer, anscheinend zufälliger Vergesslichkeit und endet im Verlust des Verstandes.

Pharmakologisch betrachtet kommt es dabei zu einer pathophysiologischen Konzentration des Amyloid- $\beta$ -Protein ( $A\beta$ ) in Neuronen und dies führt zu einer Reduktion der neuronalen  $Cl^-$ -ATPase Aktivität. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der intraneuronalen  $Cl^-$ -Konzentration und Glutamat induzierter Neurotoxizität. [16] In einer Studie mit kultivierten hippocampialen Rattenneuronen wurde der Effekt des angsthemmenden Honokiol-Derivats, Dihydrohonokiol-B, auf die Amyloid- $\beta$ -Protein ( $A\beta$ ) verursachte Änderung der  $Cl^-$ -ATPase-Aktivität, intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration und Glutamat-Neurotoxizität geprüft. DHH-B stellte den Zustand vor der  $A\beta$ -Protein verursachten Abnahme der neuronalen  $Cl^-$ -ATPase Aktivität, ohne Änderungen in der Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase und  $Mg^{2+}$ -ATPase, wieder her. DHH-B reduzierte ebenfalls die intraneuronale  $Cl^-$ -Konzentration und inhibierte die Erhöhung der Glutamat-Neurotoxizität. TPMPA ((1,2,5,6-Tetrahydropyridin-4-yl)Methyl-Phosphorsäure), ein  $GABA_C$ -Rezeptor-Antagonist, blockierte den Effekt von DHH-B. Dies deutet darauf hin, dass der  $GABA_C$ -Rezeptor am neuroprotektiven Effekt beteiligt sein könnte. Die neuroprotektive Wirkung von DHH-B, gegenüber der  $A\beta$  induzierte Hemmung der  $Cl^-$ -ATPase Aktivität, wird daher möglicherweise über den  $GABA_C$ -Rezeptor-Komplex vermittelt. [16] Zukünftig könnten also Dihydrohonokiol-B und  $GABA_C$ -Rezeptor-Agonisten als neue therapeutisch und/oder präventive Arznein bei Alzheimerpatienten verwendet werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig um den Wirkmechanismus von DHH-B aufzuklären. [16] In einer Studie von Takao Irie und seinen Mitarbeitern wurde die Wirkung von Dihydrohonokiol-B auf die Ammoniak induzierte Erhöhung der intrazellulären  $Cl^-$ -Konzentration in kultivierten hippocampialen Rattenneuronen untersucht. [17] Bereits eine geringe Konzentration von Ammoniak erhöht die intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration durch gesteigerte Expression des  $Cl^- / HCO_3^-$ -Austauschers, welcher die Antwort auf  $GABA_A$ -Rezeptorstimulation von Hyperpolarisation auf Depolarisation

ändert. DHH-B hemmt dosisabhängig die Ammoniak induzierte Erhöhung von Chlorid, ohne Effekte auf den  $\text{Cl}^-$ -Kontrolllevel. Eine komplette Hemmung erfolgt bei einer Konzentration von 10 ng/ml DHH-B. Das Isomer von Honokiol, Magnolol, hat keinen Einfluß, selbst bei einer Konzentration von 100ng/ml. Um herauszufinden, welcher Rezeptor in die Wirkung von DHH-B involviert ist, wurden 10 $\mu\text{M}$  von Bicuculline, ein  $\text{GABA}_A$ - und TPMPA, ein  $\text{GABA}_C$ -Rezeptor-Antagonist verwendet. TPMPA, aber nicht Bicuculline, hemmt komplett den Effekt von DHH-B. Dies weist darauf hin, dass DHH-B die  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren stimuliert. Um den Effekt der Rezeptorstimulation zu bewerten wurden 10 $\mu\text{M}$  Muscimol, ein  $\text{GABA}_A$ - und 200 $\mu\text{M}$  CACA (=cis-4-Aminocrotonsäure), ein  $\text{GABA}_C$ -Rezeptor-Agonist, verabreicht. CACA, aber nicht Muscimol, hemmt komplett die Ammoniak induzierte Erhöhung der neuronalen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration. Dies weist darauf hin, dass die  $\text{GABA}_C$ -Rezeptorstimulation die Ammoniak induzierte Anhäufung von Chlorid reduziert. Die Wirkung von DHH-B kann aber auch von 100 $\mu\text{M}$  Picrotoxin gehemmt werden, welches die  $\text{Cl}^-$ -Kanäle der  $\text{GABA}_A$  und  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren hemmt.  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren sind Anionen ( $\text{Cl}^-$ ) - selektive ionotrope  $\text{GABA}$ -Rezeptoren. Pharmakologisch unterscheiden sich  $\text{GABA}_C$ - von  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren in deren niedrigeren  $\text{EC}_{50}$ -Wert ( $\text{EC}_{50}$ : 1-4  $\mu\text{M}$  von  $\text{GABA}_C$ ; 5-100 $\mu\text{M}$   $\text{GABA}_A$ ). [17]

Außerdem haben sie eine geringere Selektivität gegenüber dem  $\text{GABA}_A$ - Rezeptor-Agonist oder Antagonist, Muscimol oder Bicuculline. Die Rezeptoren sind auch charakterisiert durch homo- oder heterooligomere Untereinheitszusammensetzung, lokalisiert in der Retina und dem ZNS. Außerdem unterscheiden sie sich noch in ihrem elektrophysiologischen Vermögen, einschließlich schwacher Desensibilisierung und langen Öffnungszeiten verglichen mit dem  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren. Trotzdem ist die funktionale Signifikanz von  $\text{GABA}_C$ -Rezeptoren noch unklar. Die gegenwertige Studie zeigte, daß der Effekt von DHH-B durch die  $\text{GABA}_C$ -Rezeptorstimulation vermittelt werden könnte. [17]

### **2.1.3.3 Antiinflammatorische und antibakterielle Wirkung**

Honokiol und Magnolol weisen anitbakterielle Wirkung gegenüber Akne induzierende Bakterien wie Propionibakterium Acnes und Propionibakterium Granulosum auf. P. Acnes ist eines der am häufigsten gefundenen Bakterien auf der Hautoberfläche und

spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie von Akne. P. Acnes stimuliert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, einschließlich Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), welche in der Expression von vaskulären und dermalen Adhäsionsmolekülen und der Stimulierung anderer inflammatorischer Mediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen resultieren, wodurch es zu Akne kommt. [18]

In einer Studie von Jongsung Lee und seinen Mitarbeitern wurden die antiinflammatorischen Eigenschaften und der Wirkmechanismus von Honokiol und Magnolol untersucht. Dabei wurde eine In-vitro-Screening-Methode angewandt, um zu untersuchen ob die beiden Neolignan-isomere Honokiol und Magnolol die COX-2-Aktivität und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-8 und TNF- $\alpha$ ) durch die humane Monozytenzelllinie (THP-1) inhibiert oder reduziert werden. Des Weiteren wurden die beiden zu untersuchenden Wirkstoffe, mittels DPPH (diphenylpicrylhydrazyl)- und SOD (Superoxiddismutase)-Assay auf antioxidative Eigenschaften getestet. [18]

Bei der Auswertung der Resultate wurde ersichtlich, dass Honokiol und Magnolol eine antioxidative Wirkung beim DPPH-Assay zeigten, wobei die Wirkung von Honokiol sogar wesentlich stärker war als jene von Magnolol. Dieses Ergebnis wurde auch beim SOD-Assay bestätigt. Wieder war die Wirkung von Honokiol stärker als jene von Magnolol. [18] Im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol, der aktivsten Form aller Vitamin E-Formen, zeigten Honokiol und Magnolol sogar eine tausend mal stärkere antioxidative Wirkung. [19]

Bei der inflammatorischen Reaktion spielt die Aktivität von COX-2 eine bedeutende Rolle. Es vermittelt die Produktion von Prostaglandinen aus Arachidonsäure und trägt so zur Entwicklung der inflammatorischen Antwort bei. Eine Reduktion der Prostaglandinproduktion durch Honokiol und Magnolol wurde festgestellt, wobei Honokiol hier wieder die potentere Wirkung zeigte. In der Studie ging man nun davon aus, dass womöglich Honokiol und Magnolol aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung die Prostaglandinproduktion reduzieren könnte. Um dies zu bestätigen wurde eine MTT-Untersuchung in THP-1-Zellen durchgeführt. Jedoch zeigten die Isomere keine zytotoxische Wirkung in allen getesteten Konzentrationen. Um die antiinflammatorischen Effekte zu testen, wurde eine Enzym-Immununtersuchung für IL-8 und TNF- $\alpha$  durchgeführt. Mit dem Ergebnis, dass Honokiol und im geringeren

Ausmaß auch Magnolol die Produktion von IL-8 und TNF- $\alpha$  dosisabhängig reduzierten. NF-kB ist ein Protein-Transkriptionsfaktor, welcher die Transkription verschiedener Gene, einschließlich Zytokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, Immunrezeptoren und Akute-Phase-Proteine erhöht. NF-kB ist in der Transkription vieler Zytokine involviert, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen Antwort. [18]

Jongsung Lee und seine Mitarbeiter entdeckten, dass Honokiol und Magnolol ihre antiinflammatorische Wirkung aufgrund der Hemmung der NF-kB-Aktivität ausüben. Es bestehen zwei Wege, um die NF-kB-Aktivität anzuregen. Im *canonical-pathway*, sind TRAF2, MEKK und IKK $\beta$  involviert. Im *noncanonical-pathway*, spielen NIK und IKK $\alpha$  eine wichtige Rolle. Um aufzuklären durch welchen Weg, die durch P. Acnes induzierte NF-kB-Aktivierung vermittelt wird, wurde ein Luciferase-Reporter-Assay durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass Honokiol und Magnolol die MEKK-1 vermittelte Aktivierung von NF-kB, jedoch nicht die von TRAF2, NIK und IKK hemmen. Letzendlich kann man sagen, dass Honokiol und Magnolol in den *canonical-pathway* eingreifen und die durch Propionibakterium Acnus induzierte NF-kB-Aktivierung hemmen. [18]

Dies weist darauf hin, dass Honokiol und Magnolol aufgrund ihrer antibakteriellen, antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkung als neues mögliches Akne-Linderungsmittel eingesetzt werden könnten. Weitere Studien sind noch von Nöten, um diese Wirkung zu untersuchen und den genauen Wirkmechanismus zu klären. [18]

#### **2.1.3.4 Antitumorwirkung**

Magnolol wurde in einer Vielzahl von Studien auf dessen mögliche zytotoxische Wirkung untersucht. Lin und seine Mitarbeiter berichteten, dass Magnolol in Konzentrationen von 3-10  $\mu$ M die DNA-Synthese inhibierte und dadurch die Proliferation von humanen Krebszelllinien (COLO-205 und Hep-G2) hemmte, während es keinen zytotoxischen Effekt auf humane Fibroblasten, Keratinozyten und HUVEC (Nabelschnurnerven-Endothelzellen) ausübte. [20] Ebenfalls unterbrach Magnolol den Zellzyklus zwischen G<sub>0</sub>- und G<sub>1</sub>-Phase. Bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M Magnolol wurde in den genannten Tumorzelllinien Apoptose beobachtet,

während bei den humanen Fibroblasten und HUVEC kein Schaden ersichtlich war. Auch in Xenograft-Experimenten (subkutane Injektion von Tumorzellen in Mäuse) wurde eine rasche Regression der künstlich induzierten Tumore erreicht. [20]

In einer weiteren Studie an Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass durch wiederholte Injektion von Magnolol die Metastasierung und das Tumorwachstum gehemmt wird. Es wird vermutet, dass Magnolol in der Lage ist, Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, indem es Caspasen aktiviert. [21, 22]

### **2.1.3.5 Thrombozytenaggregationshemmung**

Studien von Teng und seinen Mitarbeitern zeigten, dass Magnolol eine thrombozytenaggregationshemmende Wirkung besitzt. Magnolol inhibiert die Noradrenalin induzierten phasischen und tonischen Kontraktionen in der Brustorta von Ratten. Magnolol bewirkt eine Relaxation der vaskulären glatten Muskulatur durch Freisetzung von relaxierenden Faktoren aus dem Endothel und durch Hemmung des Kalziumeinstroms durch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle. [23]

### **2.1.3.6 Antimikrobielle Aktivität**

Honokiol und Magnolol weisen ebenfalls eine signifikante antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Säureresistente Bakterien und Pilze auf. [24]

In einer Studie von Kun-Yen Ho und dessen Mitarbeitern wurde die antimikrobielle Aktivität von Honokiol und Magnolol mittels Titerverfahren, unter Verwendung von Verdünnungsreihen untersucht und dadurch die minimale Hemmkonzentration (MHK) beider Komponenten bestimmt. [25] Die MHK gibt die geringste Konzentration einer Substanz an, bei der die Vermehrung von Mikroorganismen mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann. Anhand dieses Versuches konnte bestimmt werden, dass Honokiol und Magnolol, bei einer minimalen Hemmkonzentration von 25 µg/ml, deutliche antimikrobielle Aktivität gegen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* zeigten. Diese Bakterien tragen zu den entzündlichen Prozessen von Parodontitis bei. Kun-Yen Ho und seine Mitarbeiter

folgerten daraus, dass Honokiol und Magnolol künftig bei der Behandlung von Parodontitis, ergänzend zum Einsatz von derzeit gebräuchlichen Antibiotika, verwendet werden könnte. [25]

In einer weiteren Studie beschäftigten sich Bang KH und seine Mitarbeiter mit der Untersuchung der antimykotischen Wirkung von Honokiol und Magnolol. Dabei stellten sie fest, dass Honokiol und Magnolol eine inhibierende Wirkung gegen *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* aufzeigten, bei einer minimalen Hemmkonzentration zwischen 25 und 100 µg/ml. Diese Ergebnisse könnten bei der Entwicklung neuer Antimykotika von Bedeutung sein. [26]

## **2.2 Biotransformation**

Die Gesamtheit aller im Organismus stattfindenden biochemischen Veränderungen an endogenen Substanzen und Xenobiotika wird unter dem Begriff Biotransformation zusammengefasst. Da lipophile Substanzen nach der glomerulären Filtration in den Nierentubuli weitgehend wieder rückresorbiert werden, können sie nur langsam renal ausgeschieden werden und können so im Körper verbleiben und sich insbesondere im Fettgewebe anlagern. Das Ziel der Biotransformation ist also die Umwandlung lipophiler Substanzen in hydrophilere, leichter ausscheidbare Verbindungen, wobei die Veränderung der Hydrophilie oftmals auch zu einer Modifikation der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften einer Substanz führt. Somit kann ein Arzneistoff dadurch seine Wirkung verlieren (säureinstabile Arzneistoffe), seine Wirkung abgeschwächt oder verändert werden oder die Substanz überhaupt erst seine eigentliche Wirkung erlangen (Prodrugs). [27]

Man unterteilt den Vorgang der Biotransformation in zwei Phasen, wobei in Phase-1 funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt werden, die im Anschluß daran in Phase-2 mit hydrophilen Substanzen konjugiert werden können. In erster Linie findet die Biotransformation in der Leber statt, aber auch in anderen Organen wie in der Haut, im Darm, in der Niere oder in der Lunge finden Biotransformationsvorgänge statt. [27]

### **2.2.1 Phase-1-Reaktionen**

Im ersten Schritt der Biotransformation werden die lipophilen Moleküle oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. Dabei spielen die Oxidationsreaktionen an denen Oxidasen, Monooxygenasen und Dioxygenasen beteiligt sind eine wichtige Rolle. Von größter Bedeutung sind hierbei die mikrosomalen Monooxygenasen des Cytochrom P-450-Systems (CYP). Katalysiert von den CYP-Isoenzymen wird am Molekül durch Hydroxylierung oder Epoxylierung ein Sauerstoffatom eingeführt, wozu als Energielieferant NADPH und das Coenzym P450-Reduktase benötigt werden. Die metabolisierte Verbindung muß eine Alkan-, Alken-, aromatische oder heterozyklische Teilstruktur besitzen, damit überhaupt eine Oxidation stattfinden kann. Alkohole und Aldehyde werden durch Dehydrogenasen zu Aldehyden bzw. Carbonsäuren oxidiert, und Oxidationen an nukleophilen Gruppen, wie Aminen und Thiolen, werden durch die Flavin-Oxygenasen katalysiert. Phase-1-Reduktionen sind eher seltener als Oxidationen. Diese Reduktionen sind jedoch für den Metabolismus von Nitro- und Azoverbindungen, die zu den entsprechenden Aminoverbindungen, mit Hilfe von CYP-Enzymen, reduziert werden, von Bedeutung. Ebenso von Bedeutung ist die Hydrolyse von Estern und Amiden durch Hydrolasen und Amidasen, welche zu den entsprechenden Carbonsäuren, Alkoholen und Aminen führt. [27]

### **2.2.2 Phase-2-Reaktionen**

In der zweiten Phase der Biotransformation werden die in der Phase-1 durch Oxidationen bzw. Reduktionen entstandenen Metabolite mit hydrophilen Verbindungen, unter Katalyse spezifischer Transferasen, konjugiert. Wobei Sulfatierung und Glucuronidierung die am häufigsten auftretenden Reaktionen darstellen. [28] Glucuronidierungsreaktionen werden von den UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) in Gegenwart des CO-Substrates Uridin-5'-Diphospho- $\alpha$ -D-Glucuronsäure (UDPGA) katalysiert, wobei der Säurerest unter Ausbildung einer  $\beta$ -glykosidischen Bindung auf Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino-, und SH-Gruppen übertragen wird. [27] Sulfatierung findet primär an Alkohol- und Aminogruppen statt, wobei als Cosubstrat 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat

(PAPS) unter Katalyse der Sulfotransferasen fungiert. Häufig kommen Glucuronidierung und Sulfatierung gleichzeitig vor. Bedingt durch die unterschiedliche Reaktionskinetik und den limitierten PAPS-Pool der Zellen, tritt in niedrigen Substratkonzentrationen vermehrt Sulfatierung, in höheren Glucuronidierung auf. Weitere Phase-2-Reaktionen sind noch die Konjugation mit Glutathion, Fett- und Aminosäuren, Methylierung und Acetylierung. [27]

## 3 EXPERIMENTELLER TEIL

### 3.1 *Materialien*

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischer Reinheit und konnten dadurch ohne Vorreinigung verwendet werden.

Die Materialien wurden wie folgt bezogen:

Honokiol	von W.Schühly, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Graz dankenswerterweise erhalten
Methanol (HPLC-Analyse)	J.T. Baker, Deventer, NL
Ammonacetat 97%	Sigma Albrich, Wien
Ammonacetat 99,99%	Sigma Albrich, Wien
$\beta$ -Glucuronidase Typ B-3 aus boviner Leber	Sigma Albrich, Wien
Sulfatase Typ V aus Patella vulgata	Sigma Albrich, Wien

Alle nicht angeführten sowohl organischen als auch anorganischen Chemikalien wurden von der Firma Sigma Albrich, Wien, gekauft.

### 3.2 *Geräte*

HPLC-Anlage (Shimadzu, Kyoto, Japan):

- Merck Hitachi L-7200 Autoinjektor (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2 LC6 A Niederdruck-Gradientenpumpen
- CTO-10AC Säulenofen
- SPD 6HV UV/VIS-Detektor
- Interface- D- 7000

### HPLC/MS-Anlage

- HPLC: 1100 Series HPLC System (Agilent)
- UV-Detektor: G1315B DAD (Agilent)
- MS: 4000 QTrap (Applied Biosystems)

### Sonstige Geräte:

- pH –Meter Model 250, Orion Research Inc., Boston, MA, USA
- Ultraschallbad Starsonic, 60, PMT, Wien, Österreich
- Waage (Teilung: 0.0001g, Höchstlast: 31g), Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Ultraturrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
- Rollpumpe PA-SF, IKA-Labortechnik, Staufen in Breisgau, Deutschland
- Zentrifuge Biofudge T13, Heraeus, Deutschland

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 Die isoliert perfundierte Rattenleber**

Das Modell der isolierten, perfundierten Leber wird bevorzugt dann benutzt, wenn die hepatische Biotransformation und Disposition von Xenobiotika in einer annähernd physiologischen Umgebung ohne Einfluß anderer Organe und Gewebe untersucht werden soll. Das Modell hat den Vorteil, dass die Versuchsbedingungen wie Temperatur, Druck, pH-Wert und Ionenkonzentration fast vollständig frei gewählt werden können, und noch dazu der apparative Aufwand gering ist. Die gute Reproduzierbarkeit und das breite Anwendungsgebiet zeichnen ebenfalls diese Methode aus.

#### Isolierung des Organs und Vorbereitung der Versuchsanordnung

Als Leberspender wurden männliche Sprague Dawley-Ratten aus der Versuchstierzucht und –haltung der Universität Wien, Himberg, Österreich verwendet. (Tabelle 1)

Tabelle 1: Körper- und Lebergewicht der Versuchstiere in g

Ratte	Körpergewicht	Lebergewicht
1	273 g	14,1 g
2	320 g	10,0 g
3	233 g	11,4 g

Das Versuchstier wird mit Thiopental narkotisiert (Thiopental: 8-10 mg/100g Körpergewicht, i.p.) und die Leber wird freigelegt. Anschließend wird der Ductus hepaticus abgebunden, angeschnitten, mit einem PE 10-Rohr kanuliert und wieder abgebunden. Nach Ligierung der Vena porta, Vena cava inferior, Aorta abdominalis und des Ösophagus, wird Heparin (1500 IE) zur Hemmung der Blutgerinnung in die Milz injiziert und in die Vena porta und Vena cava inferior Glaskanülen (1.5 mm) eingefügt. Die Leber wird vorsichtig entnommen, sofort gewogen und über die Kanülen innerhalb von 5 Minuten an den künstlichen Kreislauf angeschlossen.

Das Perfusionsmedium, Krebs-Henseleit-Puffer (Tabelle2), wird während der gesamten Versuchsdauer mit Hilfe eines Wasserbades bei einer konstanten Temperatur von 41.5°C gehalten und mit einem Gemisch aus 93% Sauerstoff und 7% Kohlendioxid begast. Über eine Rollpumpe, die die Peristaltik imitiert, wird das Medium mit einer Durchflußrate von 3 ml pro Gramm Leber pro Minute zur Leber geleitet und erreicht unter diesen Bedingungen durch Verlust an Wärme und Kohlendioxid die Leber mit einer Temperatur von 37°C und pH 7.4.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Perfusionsmediums (Krebs-Henseleit-Puffer; KHP)

Substanz	Konzentration (mM/l)	Substanz	Konzentration (mMol/l)
NaCl	118,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,2
KCl	4,5	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,2
CaCl <sub>2</sub>	2,8	NaHCO <sub>3</sub>	25,0

Effluentes Perfusat wird über eine Kanüle abgeleitet und gesammelt, die Galletropfen, die aus dem Röhrchen aus dem Gallengang kommen, passieren eine

Lichtschanke, um die Tropfen zu zählen und um so den Gallenfluß in mg/g Leber/min nach der folgenden Formel zu berechnen:

$$GF = \frac{F \times G_{\text{Tropfen}}}{G_{\text{Leber}}}$$

wobei

- GF = Gallefluß in mg/g Leber . min
- F = Tropfenfrequenz in Tropfen /min
- G<sub>Tropfen</sub> = Tropfengewicht in mg/Tropfen
- G<sub>Leber</sub> = Lebergewicht in g

#### Durchführung der Perfusion und Probenaufarbeitung

Zur Stabilisierung des Galleflusses und zur Reinigung der Leber wird 25 Minuten mit Medium ohne Substanzzugabe vorperfundiert. Anschließend wird auf eine Lösung der jeweiligen Testsubstanz umgeschaltet und für weitere 90 Minuten perfundiert. Während des Experimentes werden sowohl Galle als auch Perfusatproben in Intervallen von 5 Minuten gesammelt, sofort über Trockeneis schockgefroren und bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse werden die Proben schonend aufgetaut und wie in Tabelle 3 beschrieben aufgearbeitet.

Tabelle 3: Vorbereitung der Galle- und Perfusatproben

	<b>Galleproben</b>	<b>Perfusatproben</b>
<b>Verdünnung</b>	5 µl Galle, 95 µl NH <sub>4</sub> -acetat (5 mM) pH 7.4	unverdünnt
<b>Injektvolumen</b>	80 µl	80 µl

### 3.3.2 HPLC-System

Um die einzelnen Metabolite nachweisen zu können bzw. zu deren quantitativer Bestimmung wurde ein geeignetes HPLC-System entwickelt.

Tabelle 4: Parameter des HPLC Systems für Honokiol

Parameter	
<b>Säule</b>	Hypersil BDS-C18 (5 $\mu$ M, 250x 4.6 I.D., Astmoor, England);
<b>Vorsäule</b>	Hypersil BDS-C18 (5 $\mu$ M, 10 x 4.6 I.D., Astmoor, England)
<b>Säulentemperatur</b>	15°C
<b>Wellenlänge</b>	294 nm
<b>Fluß</b>	1 ml/min
<b>Eluent A</b>	NH <sub>4</sub> -acetat (5 mM) pH 7.4
<b>Eluent B</b>	Methanol
<b>Injektvolumen</b>	20 $\mu$ l

Vor der Analyse wurden die beiden Eluenten, NH<sub>4</sub>-acetat und Methanol, im Ultraschallbad entgast. Das Mischungsverhältnis der beiden Komponenten wurde entlang der folgenden Gradienten (Abbildung 6) verändert:

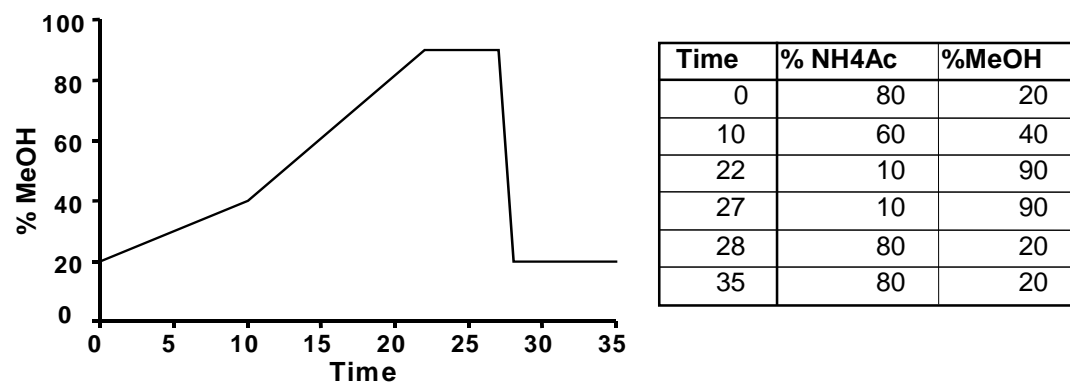


Abbildung 7: HPLC Gradient für die Trennung von Honokiol und dessen Metabolite

### **3.3.3 Strukturaufklärung der Metabolite von Honokiol**

Da noch keine Daten über die Struktur der Metabolite von Honokiol vorhanden sind und somit kein Vergleich der Retentionszeiten der gefundenen Metabolitenpeaks mit den Retentionszeiten von synthetischen Standards durchgeführt werden können, wurden die Strukturen mittels enzymatischer Hydrolyse bzw. LC/MS-Analyse aufgeklärt.

#### Enzymatische Hydrolyse der Metabolite

Um feststellen zu können, ob eine Konjugation des lipophilen Honokiol mit Schwefelsäure und/oder Glucuronsäure stattgefunden hat, wurden 5 µl Galleproben 60 Minuten lang bei 37°C mit 20 µl Sulfatase bzw. mit 2.5 µl Glucuronidase inkubiert. Weitere 5 µl Galleproben wurden anschließend 24 Stunden lang bei 37°C mit 20 µl Sulfatase bzw. 2.5 µl Glucuronidase inkubiert. Parallel dazu wurde zu jeder, mit Sulfatase bzw. Glucuronidase, versetzten Galleprobe eine Referenzlösung mit dem Inhalt von 5 µl Galleprobe mit 20 µl bzw. 2.5 µl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7.4) inkubiert. Danach wurden die Proben der HPLC-Analyse unterworfen.

#### LC/MS

Genauere Strukturvorschläge erfolgten durch LC/MS Analysen, wobei die Metaboliten zunächst durch die in Kapitel 3.3.2 beschriebenen HPLC Systeme getrennt und nach erfolgter Elektronenspray-Ionisierung anhand der nachfolgend beschriebenen Parameter massenspektrometrisch untersucht wurden.

#### Parameter für die LC/MS Messungen:

##### **Massenspektrometer:**

Quellenparameter: TurbolonSpray Electrospray (ESI) source

Curtain Gas: 10 psi (99.5% N<sub>2</sub>)

Collision: Gas High

Ion Spray Voltage: -4000 V

Temperature: 550°C  
Ion source gas 1 (sheath gas): 30 psi  
Ion source gas 2 (drying gas): 50 psi  
Interface heater: ON  
Declustering potential: -30V  
Entrance potential: -10V

Full MS scan: Scan range: 260-750 amu, 1 sec scan time  
negative polarity  
unit resolution

EPI-Meßmodus: Dynamic fill time (Lineare Ionenfalle wird gefüllt bis eine bestimmte Ionenanzahl erreicht wird und dann ausgelesen)  
negative polarity  
Scan speed: 1000 amu/sec  
Cell Exit Potential: -10V

### **3.3.4 Leberextraktion**

Eine Leberextraktion wird durchgeführt, um herauszufinden ob nach erfolgter Perfusion noch Anteile an Metaboliten bzw. nativen Honokiol in der Leber verblieben sind.

Hierfür werden die eingefrorenen Leberproben schonend aufgetaut und danach Anteile entnommen, gewogen, und pro 100 mg Leber werden 500 µl Puffer zugegeben (Tabelle 6). In einem weiteren Schritt werden die Proben mittels Ultraturrax homogenisiert. Anschließend werden 2 ml des Homogenisates entnommen und 10 Minuten lang zentrifugiert. Danach wird 1 ml vom Überstand entnommen, und nochmals 5 Minuten zentrifugiert. Von diesem Überstand werden 250 µl abgezogen, und diese mit 500 µl reinem Methanol versetzt und nochmals zentrifugiert. 500 µl dieses Überstandes wird für die HPLC-Analyse gebraucht.

Tabelle 5: Parameter für die Leberextraktion

Ratte	Gewicht der Leberprobe	Menge an Puffer
1	630,3 mg	3151,5 µg
2	546,2 mg	2731 µg
3	529,1 mg	2645,6 µg

### 3.3.5 Auswertung und Statistische Methoden

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe externer Eichung durchgeführt, wobei die Proben im Medium der zu vermessenden Proben (Puffer, pH-Wert) vorbereitet und die Konzentrationsbereiche entsprechend den Konzentrationen in den jeweiligen Proben gewählt wurden. Alle in dieser Arbeit angeführten Daten stellen Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelbestimmungen dar.

#### Berechnung der Leberperfusionen:

- Sekretionsgeschwindigkeit (V) im effluenten Perfusat:

$$V \text{ (nmol/ g Leber.min)} = \frac{C \times \text{Flow} \times 1000}{\text{MG} \times \text{LG}} \quad (1)$$

wobei C = Konzentration der Metabolite in µg/ml

Flow = Durchflußrate in ml/min

MG = Molekulargewicht

LG = Lebergewicht in g

- Sekretionsgeschwindigkeit in der Galle:

$$V \text{ (nmol/ g Leber.min)} = \frac{C \times GF}{MG} \quad (2)$$

wobei C = Konzentration der Metabolite in  $\mu\text{g/ml}$

MG = Molekulargewicht

- Prozentuelle Verteilung der Metabolite ( $FM_x$ ):

$$FM_x = \frac{CM_x \times LG \times 100}{C_{in}} \quad (3)$$

wobei  $CM_x$  = Kumulative Sekretion des jeweiligen Metaboliten im jeweiligen Medium in  $\text{pmol/90min}$

$C_{in}$  = Kumulative Konzentration der nativen Substanz, die der Leber zugeführt wird in  $\text{pmol/ 90 min}$

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Trennung und Quantifizierung von Honokiol und dessen Biotransformationsprodukte mittels HPLC

Zur Trennung der Metabolite von Honokiol bzw. zur Erfassung deren Gehalts in Galle und Perfusat, wurde das in Kapitel 3 beschriebene HPLC-System verwendet.

Hierfür wurden drei Sprague Dawley-Ratten mit einer 20  $\mu$ molaren Honokiollösung perfundiert, und danach die Galle und ein aliquoter Teil (10 ml) des Perfusates in fünf Minutenintervallen gesammelt, und deren Gehalte an Biotransformationsprodukten durch die HPLC-Analyse bestimmt (Abbildung 10 und 11). Weiters wurden mit einer Sprague Dawley-Rattenleber Kontrollperfusionen ohne Honokiol durchgeführt, um die Ausscheidung von störenden Gallebestandteilen zu überprüfen (Abbildung 12 und 13).

In den Abbildungen 10 und 11 wird ersichtlich, dass sowohl in den Galleproben als auch in den Perfusatproben der Sprague Dawley-Ratten neben Honokiol zwei Metabolite detektiert wurden. Bei dem ersten Metabolit (M1) handelt es sich um ein Diglucuronid und bei dem zweiten Metabolit (M2) um ein Monoglucuronid. In den Galle- und Perfusatproben wurden zwar mehr als nur zwei Metabolite gefunden, jedoch konnten nur diese zwei mittels HPLC-MS detektiert werden. Honokiol wurde bei einer Retentionszeit von 26,86 min detektiert. Seine Metabolite M1 und M2 lagen bei 16,85 und 21,84 min (Tabelle 6).

Tabelle 6: Retentionszeiten von Honokiol und dessen Metabolite

Substanz	Galle/ Perfusat
M1	16,85
M 2	21,84
Honokiol	26,86

Die Quantifizierung der Daten, die bei der HPLC- Analyse der Galle- und Perfusatproben erhalten wurden, erfolgt mittels externer Eichung. Die Proben wurden im Medium der zu vermessenden Proben (Puffer, pH-Wert) vorbereitet und die Konzentrationsbereiche entsprechend den Konzentrationen in den jeweiligen Proben gewählt (siehe Eichgerade Abbildung 9).

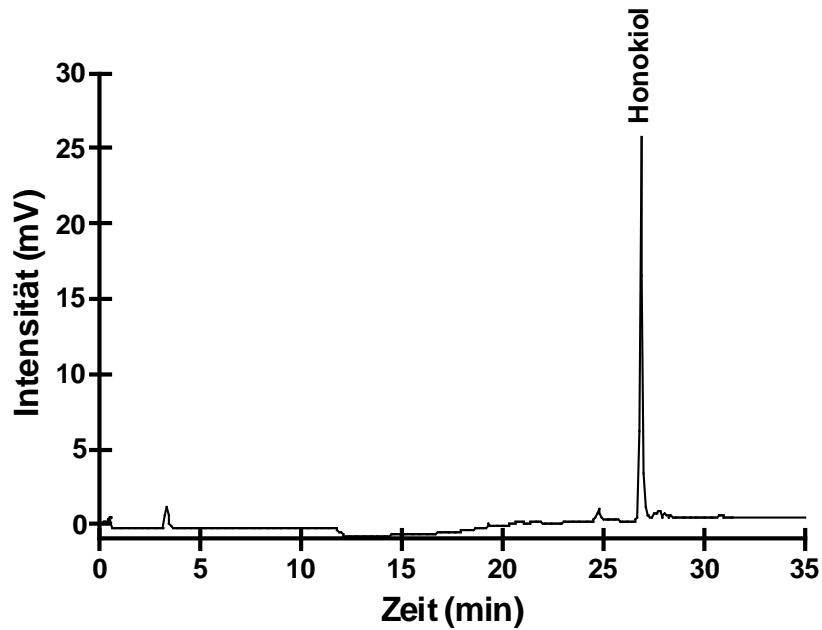


Abbildung 8: Typisches Chromatogramm von Honokiol

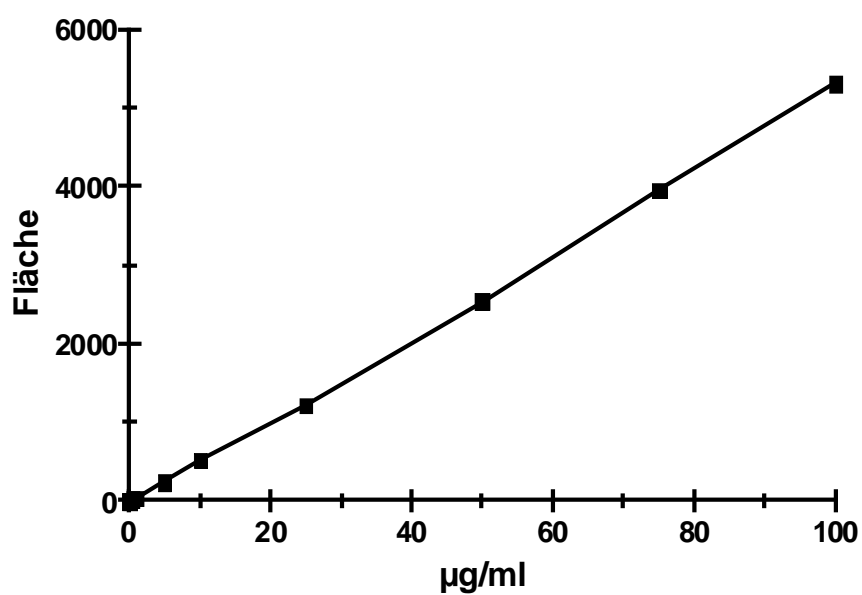


Abbildung 9: Eichgerade für Honokiol

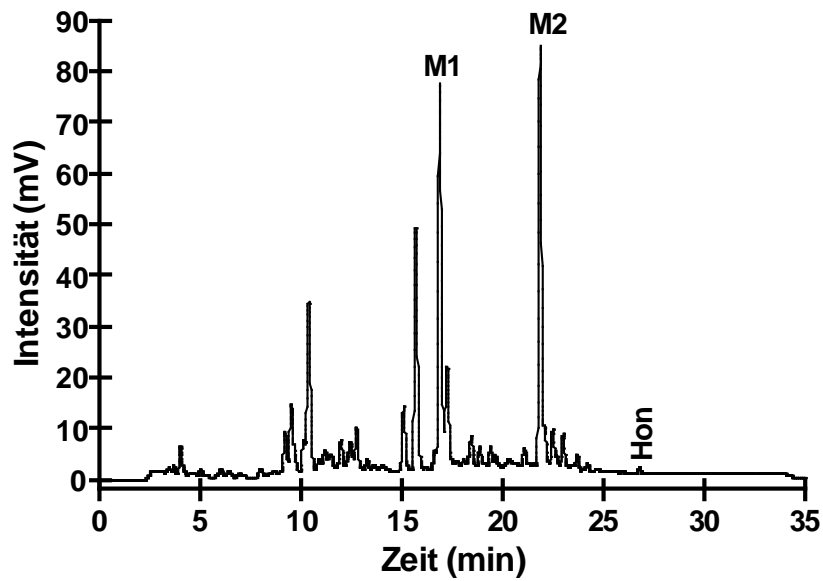


Abbildung 10: Chromatogramm einer Gallenprobe einer Sprague Dawley-Ratte (R1) nach 60 Minuten Perfusion

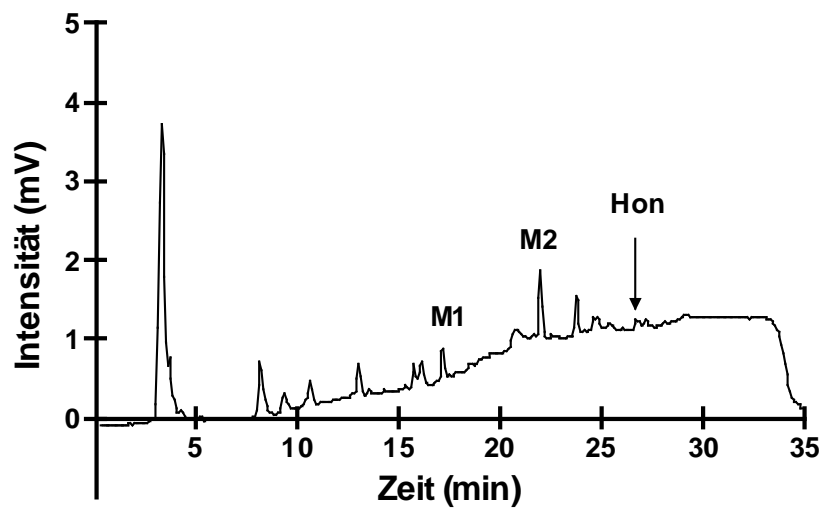


Abbildung 11: Chromatogramm einer Perfusatprobe einer Sprague Dawley-Ratte (R1) nach 60 Minuten Perfusion

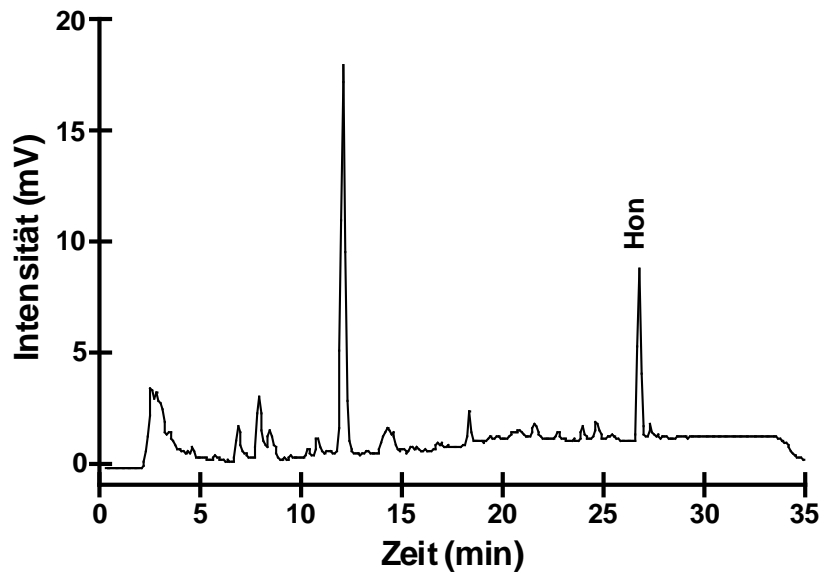


Abbildung 12: Chromatogramm einer Kontrollgalle einer Sprague Dawley-Ratte (R1), versetzt mit Honokiol

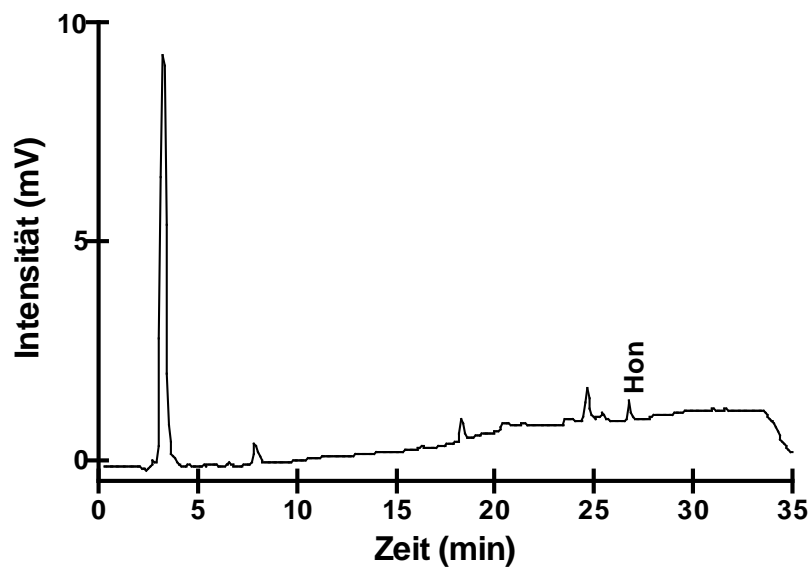


Abbildung 13: Chromatogramm eines Kontrollperfusates einer Sprague Dawley-Ratte (R1), versetzt mit Honokiol

## **4.2 Strukturaufklärung der Biotransformationsprodukte**

### **4.2.1 Enzymatische Hydrolyse**

Zur Untersuchung der Struktur der Metabolite von Honokiol, wurden zunächst die Galleproben der enzymatischen Hydrolyse durch  $\beta$ -Glucuronidase unterworfen. Die Reduktion der Peakflächen einzelner Metabolite bzw. deren Verschwinden deutete auf den Einfluß des hydrolytischen Enzyms bzw. auf eine ein- oder mehrfache Konjugation mit Glucuronsäure hin ( Daten nicht gezeigt).

Die selben Galleproben wurden zusätzlich auch mit dem Enzym Sulfatase behandelt, jedoch zeigte sich hier keine Reduktion der Peakflächen. Dies lässt darauf schließen, dass keine enzymatische Hydrolyse durch die Sulfatase stattfand (Daten nicht gezeigt).

### **4.2.2 Massenspektrometrie (LC/MS)**

Massenspektrometrische Untersuchungen (LC/MS) wurden zur weiteren Aufklärung der Struktur der Metabolite von Honokiol herangezogen. Hierfür wurden die Metabolite durch das gleiche HPLC-System, das bereits zur quantitativen Analyse verwendet wurde getrennt, und nach Elektronenspray- Ionisierung massenspektrometrisch analysiert.

Das Massenspektrum des nativen Honokiols (Abbildung 14) zeigt ein Molekülionenpeak bei  $m/z = 265$ , welches für das Honokiol steht. Das Molekülion  $m/z = 224$  entspricht dem Honokiol- Fragment.

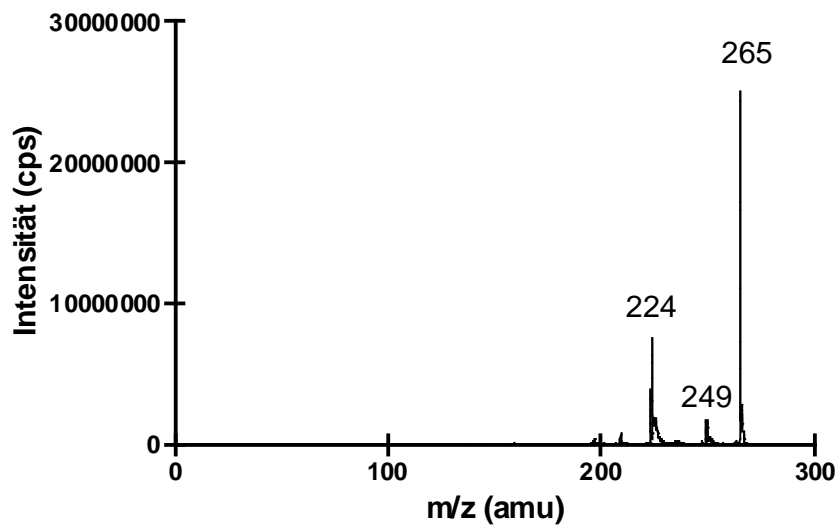


Abbildung 14: Massenspektrum des nativen Honokiols

Beim Metaboliten M1 (Abbildung 15) zeigte sich folgendes Fragmentationsmuster –  $m/z = 265$  entspricht dem nativen Honokiol,  $m/z = 441$  steht für das monoglucuronidierte Honokiol und bei  $m/z = 617$  handelt es sich um das diglucuronidierte Honokiol.

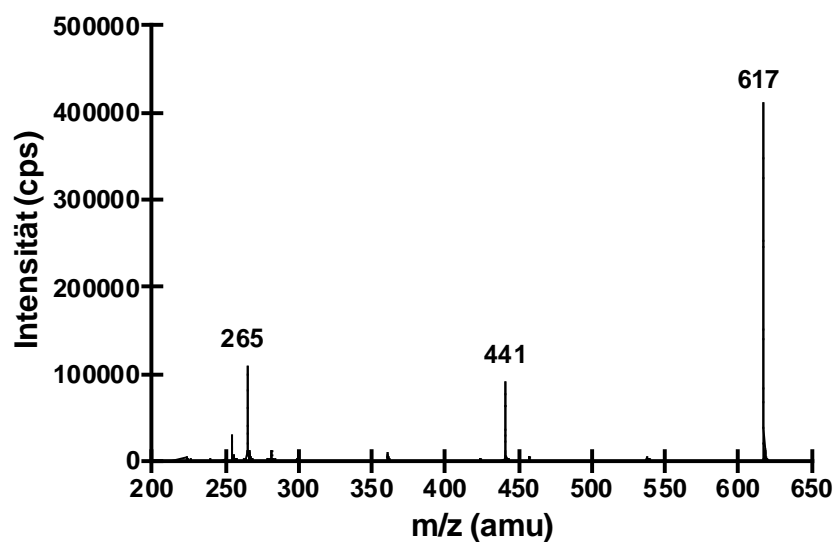


Abbildung 15: Massenspektrum des Metaboliten M1

Metabolit 2 zeigt in Abbildung 16, ebenso ein Molekülionenpeak bei  $m/z = 265$ , welches für das native Honokiol steht, dazu das monoglucuronidierte Honokiol bei  $m/z = 441$  und das Honokiol- Fragment bei  $m/z = 224$ .

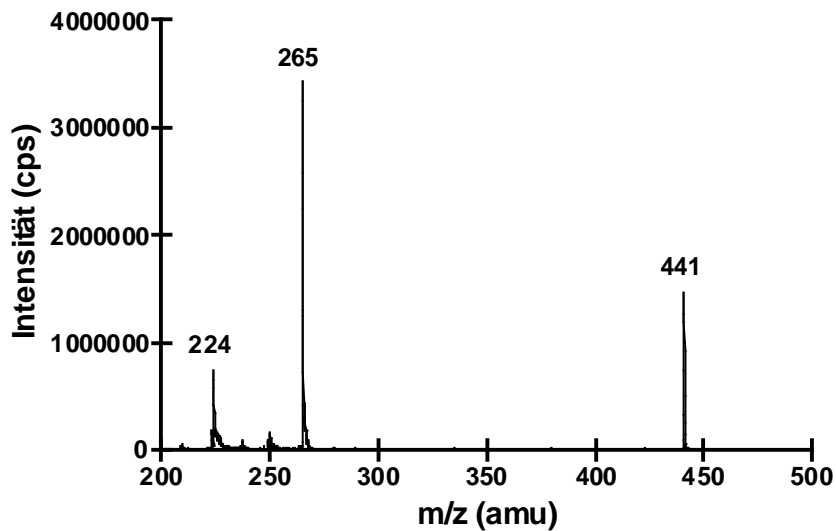


Abbildung 16: Massenspektrum des Metaboliten M2

### ***4.3 Metabolismus von Honokiol in der isolierten perfundierten Rattenleber***

#### ***4.3.1 Einfluß von Honokiol auf den Gallefluß***

Mittels Lichtschrankenmessung wurde der Gallefluß während der Perfusion gemessen, und wie in Abbildung 17 veranschaulicht, zeigt sich nach Zugabe von Honokiol eine leichte Abnahme des Galleflusses von  $0,83 \mu\text{g/g Leber}/\text{min}$ . auf  $0,65 \mu\text{g/g Leber}/\text{min}$ .

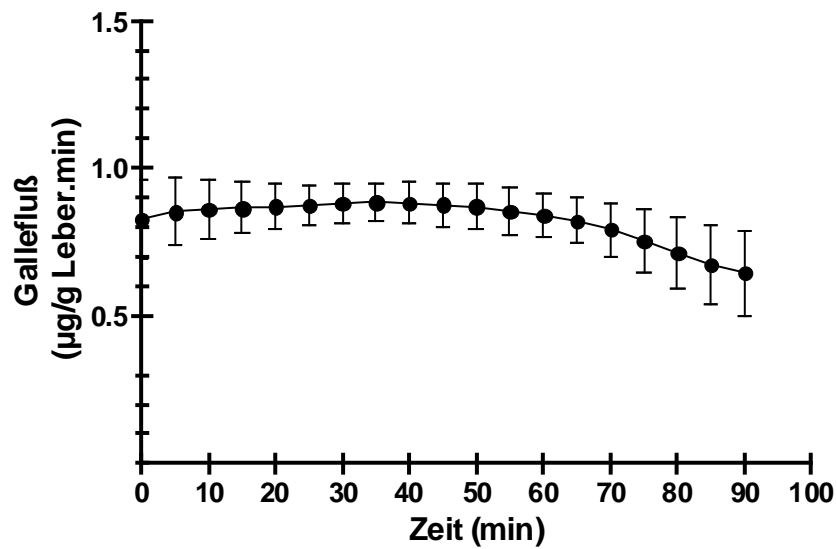


Abbildung 17: Einfluß von Honokiol auf den Gallefluß von Sprague Dawley- Ratten

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen des Einfluß von Honokiol auf den Gallefluß von Sprague Dawley- Ratten (n=3)

Zeit [min]	MW	SD
-5	0,81	0,12
0	0,83	0,13
5	0,85	0,11
10	0,86	0,10
15	0,87	0,09
20	0,87	0,08
25	0,88	0,07
30	0,88	0,07
35	0,88	0,07
40	0,88	0,07
45	0,88	0,07
50	0,87	0,08
55	0,85	0,08
60	0,84	0,07
65	0,82	0,08
70	0,79	0,09
75	0,75	0,11
80	0,72	0,12
85	0,67	0,14
90	0,65	0,15

### **4.3.2 Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite in die Galle**

Um die hepatische Biotransformation von Honokiol ohne störende Einflüsse anderer Organe und Gewebe untersuchen zu können, eignet sich besonders das Modell der isolierten perfundierten Rattenleber.

Nach Verabreichung von 20  $\mu\text{M}$  Honokiol zum Perfusionsmedium wurden Galleproben in Intervallen von 5 Minuten gesammelt und anschließend der HPLC-Analyse unterworfen. Mit Hilfe der Eichgeraden wurden die erhaltenen Peakflächen als  $\mu\text{g/ml}$  – Werte berechnet. Zur Bestimmung der Sekretionsgeschwindigkeit ( $\text{pmol/g Leber}\cdot\text{min}$ ), müssen ebenso das Lebergewicht in g und der Gallefluß für das jeweilige Zeitintervall in  $\text{ml/min}$ . in die Berechnung miteingeschlossen werden, sodass auch geringe Schwankungen der Sekretion erkannt werden können. Aus den Werten der einzelnen Tiere wurde der statistische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die graphische Darstellung der durchschnittlichen Sekretion von Honokiol und dessen Metabolite in die Galle von Sprague Dawley-Ratten innerhalb von 90 Minuten.

Die Sekretionskurve von Honokiol in Abbildung 18, zeichnet sich durch einen steilen Anstieg innerhalb der ersten 20 Minuten aus. Gefolgt von einem kontinuierlichen Kurvenanstieg in den darauffolgenden 40 Minuten auf einen Maximalwert von 13,1  $\text{pmol/g Leber}\cdot\text{min}$ . Danach fällt die Kurve bis zur 80. Minute ab und in den verbleibenden 10 Minuten steigt die Kurve geringfügig an.

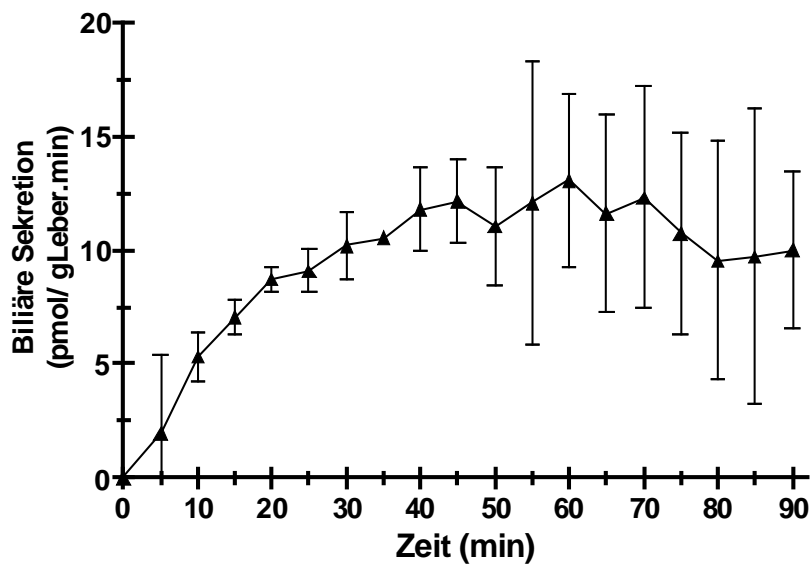


Abbildung 18: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit von Honokiol in die Galle von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeiten von Honokiol in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min

Zeit [min]	Honokiol	SD
0	0,0	0,0
5	2,0	3,4
10	5,3	1,1
15	7,0	0,7
20	8,7	0,5
25	9,1	1,0
30	10,2	1,5
35	10,5	0,3
40	11,8	1,9
45	12,1	1,8
50	11,0	2,6
55	12,1	6,2
60	13,1	3,8
65	11,6	4,3
70	12,3	4,9
75	10,7	4,4
80	9,5	5,2
85	9,7	6,5
90	10,0	3,4

Der Sekretionsverlauf des Metaboliten M1 in Abbildung 19, zeigt einen steilen Anstieg innerhalb der ersten 45 Minuten auf einen Maximalwert von 321,0 pmol/g Leber.min. Danach fällt die Kurve wieder steil ab.

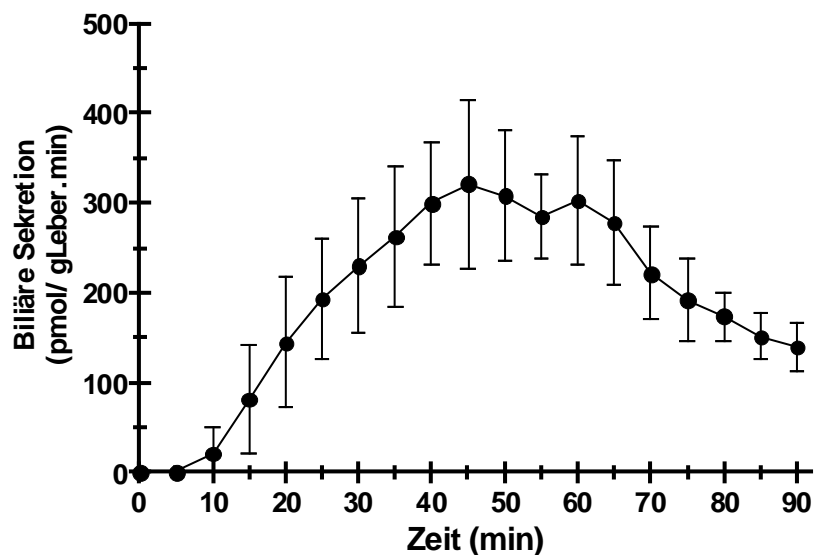


Abbildung 19: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeiten des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min

Zeit [min]	M1	SD
0	0,0	0,0
5	0,2	0,3
10	21,4	27,8
15	81,2	61,2
20	144,5	73,1
25	192,5	66,9
30	229,6	75,2
35	262,1	77,3
40	299,5	68,5
45	321,0	93,4
50	307,9	72,0

Fortsetzung Tabelle 9:

<b>55</b>	284,1	47,5
<b>60</b>	302,9	71,2
<b>65</b>	277,8	68,4
<b>70</b>	221,2	51,5
<b>75</b>	192,0	44,9
<b>80</b>	173,7	26,9
<b>85</b>	151,1	25,7
<b>90</b>	139,7	26,5

Die Sekretionskurve des Metaboliten M2 (Abbildung 20) weist einen verzögerten Kurvenbeginn auf. Diese beginnt erst nach 5 Minuten und weist einen steilen Anstieg, mit einem Maximalwert von 676,7 pmol/g Leber.min nach 45 Minuten, auf. Danach fällt die Kurve merklich ab.

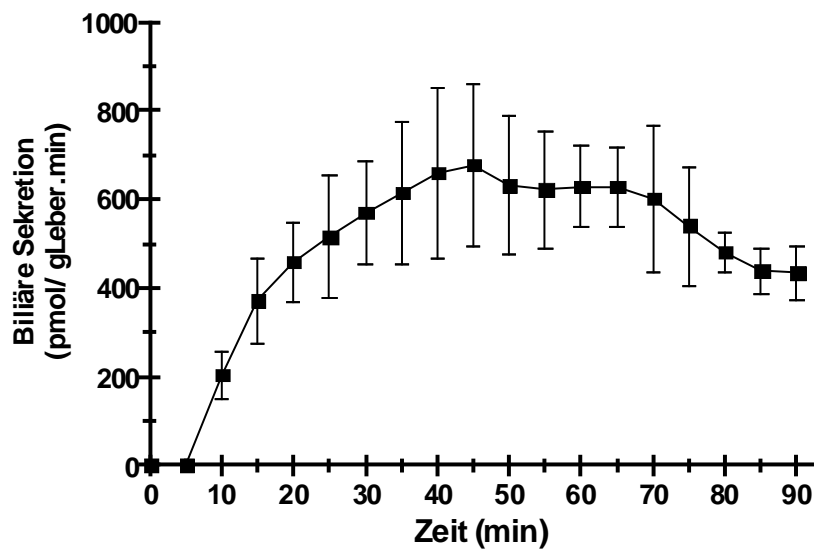


Abbildung 20: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeiten des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min

<b>Zeit [min]</b>	<b>M2</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0
<b>5</b>	0,0	0,0
<b>10</b>	203,6	54,1
<b>15</b>	370,9	95,6
<b>20</b>	457,8	87,6
<b>25</b>	513,9	138,5
<b>30</b>	569,9	116,7
<b>35</b>	614,3	159,2
<b>40</b>	657,7	192,8
<b>45</b>	676,7	184,6
<b>50</b>	630,9	156,7
<b>55</b>	621,9	133,1
<b>60</b>	628,1	91,3
<b>65</b>	626,9	88,7
<b>70</b>	600,2	163,9
<b>75</b>	540,1	134,3
<b>80</b>	479,0	45,6
<b>85</b>	438,3	52,2
<b>90</b>	434,1	59,1

#### ***4.3.3 Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite ins Perfusat***

Während der Perfusion der Leber wurden zusätzlich zu den Galleproben auch aliquote Anteile des Perfusates in einem Zeitintervall von 5 Minuten gesammelt, und ebenso der HPLC- Analyse unterworfen. Hierbei wurde ebenfalls die Sekretionsgeschwindigkeit in pmol/g Leber.min unter Berücksichtigung der

Lebergewichte in g der einzelnen Versuchstiere bzw. der Durchflußgeschwindigkeit in ml/min berechnet.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den durchschnittlichen Efflux von Honokiol und dessen Metabolite in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten innerhalb einer Zeitspanne von 90 Minuten.

In Abbildung 21 wird ersichtlich, dass kein Efflux von Honokiol innerhalb der ersten 15 Minuten zu beobachten ist. Erst danach steigert sich die Sekretionsgeschwindigkeit beträchtlich und erreicht schließlich nach 55 Minuten einen Höchstwert von 307,6 pmol/g Leber.min. Darauffolgend bildet die Kurve ein Plateau.

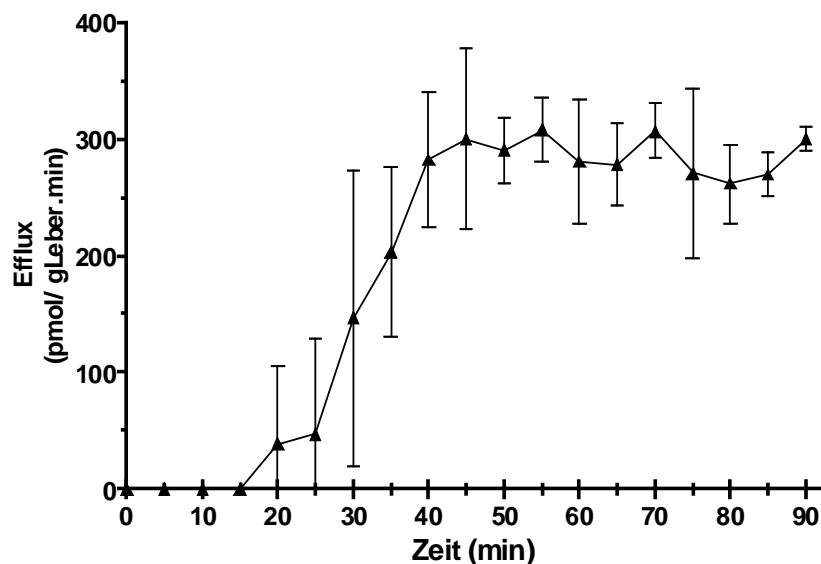


Abbildung 21: Durchschnittlicher Efflux von Honokiol in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeiten von Honokiol in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min

Zeit [min]	Honokiol	SD
0	0,0	0,0
5	0,0	0,0
10	0,0	0,0
15	0,0	0,0

Fortsetzung Tabelle 11:

<b>20</b>	38,7	67,0
<b>25</b>	47,0	81,5
<b>30</b>	146,6	127,0
<b>35</b>	203,1	72,7
<b>40</b>	281,9	57,7
<b>45</b>	299,8	77,7
<b>50</b>	290,5	28,3
<b>55</b>	307,7	27,8
<b>60</b>	280,8	53,2
<b>65</b>	278,0	35,7
<b>70</b>	306,5	23,5
<b>75</b>	270,5	72,4
<b>80</b>	261,5	33,8
<b>85</b>	269,3	19,0
<b>90</b>	299,7	10,1

Die Ausscheidung des Metaboliten M1 (Abbildung 22) beginnt erst nach 50 Minuten. Der Kurvenanstieg erfolgt kontinuierlich bei einem Maximalwert von 221,7 pmol/g Leber.min nach 90 Minuten.

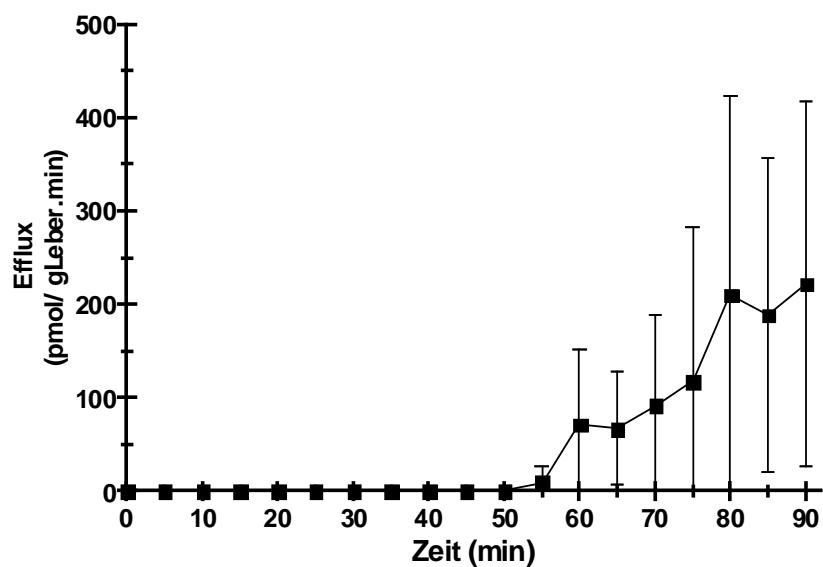


Abbildung 22: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M1 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeiten des Metaboliten M1 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min

<b>Zeit [min]</b>	<b>M1</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0
<b>5</b>	0,0	0,0
<b>10</b>	0,0	0,0
<b>15</b>	0,0	0,0
<b>20</b>	0,0	0,0
<b>25</b>	0,0	0,0
<b>30</b>	0,0	0,0
<b>35</b>	0,0	0,0
<b>40</b>	0,0	0,0
<b>45</b>	0,0	0,0
<b>50</b>	0,0	0,0
<b>55</b>	9,4	16,2
<b>60</b>	71,2	79,5
<b>65</b>	66,6	60,9
<b>70</b>	91,1	96,7
<b>75</b>	117,1	165,6
<b>80</b>	210,0	213,5
<b>85</b>	188,4	168,8
<b>90</b>	221,7	195,3

Die Sekretionskurve des Metaboliten M2 (Abbildung 23) zeigt ebenfalls eine verzögerte Sekretion, nämlich nach 25 Minuten. Es folgt ein kontinuierlicher Kurvenanstieg bis zum Erreichen eines Höchstwertes von 1644,6 pmol/g Leber.min nach 90 Minuten.

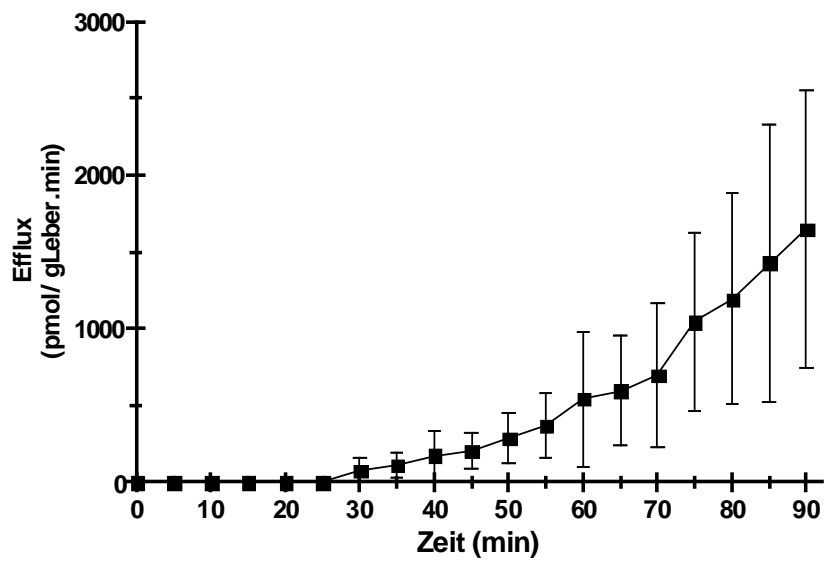


Abbildung 23: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M2 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeiten des Metaboliten M2 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min

Zeit [min]	M2	SD
0	0,0	0,0
5	0,0	0,0
10	0,0	0,0
15	0,0	0,0
20	0,0	0,0
25	0,0	0,0
30	69,9	156,3
35	58,1	204,9
40	76,2	357,7
45	171,5	337,4
50	220,0	475,5
55	284,8	603,4
60	247,6	1044,0
65	375,1	1012,6

Fortsetzung Tabelle 13:

<b>70</b>	518,1	1224,8
<b>75</b>	636,2	1451,1
<b>80</b>	705,5	1678,5
<b>85</b>	789,8	2066,9
<b>90</b>	1004,1	2285,2

#### **4.3.4 Kumulative biliäre Sekretion von Honokiol und dessen Metabolite in der Galle**

Abbildung 24 und 25 zeigen, dass M2 den größten Anteil an der kumulativen Sekretion in der Galle darstellt, gefolgt von M1 und Honokiol.

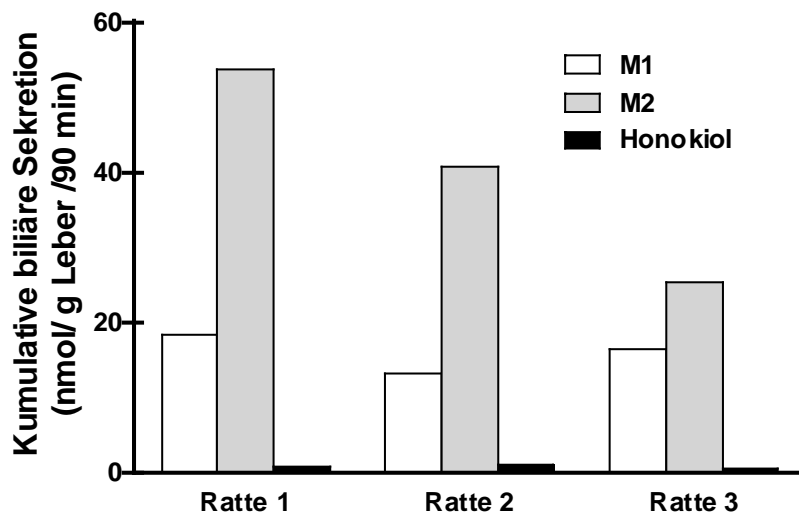


Abbildung 24: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol in der Galle von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

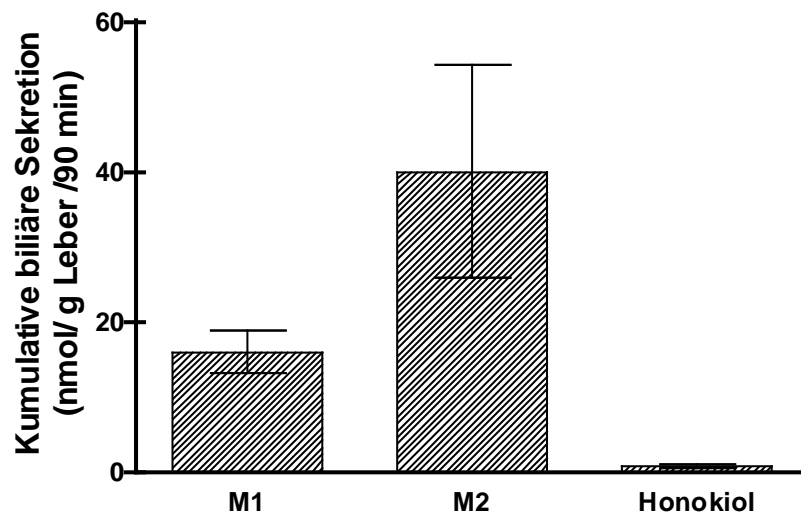


Abbildung 25: Gesamte Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol in der Galle von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären Sekretion in der Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in nmol/g Leber/90 Minuten

Substanz	MW	SD
<b>M1</b>	16,0	2,7
<b>M2</b>	40,0	14,2
<b>Honokiol</b>	0,8	0,3

#### ***4.3.5 Kumulative biliäre Sekretion von Honokiol und dessen Metabolite im Perfusat***

In Abbildung 26 wird ersichtlich, dass M2 den größten Anteil an der kumulativen Sekretion im Perfusat darstellt, und zwar besonders ausgeprägt in Ratte 2. In Ratte 3 zeigt Honokiol den größten Anteil an der kumulativen Sekretion im Perfusat. M1 hingegen weist in allen drei Ratten nur einen geringen Anteil auf.

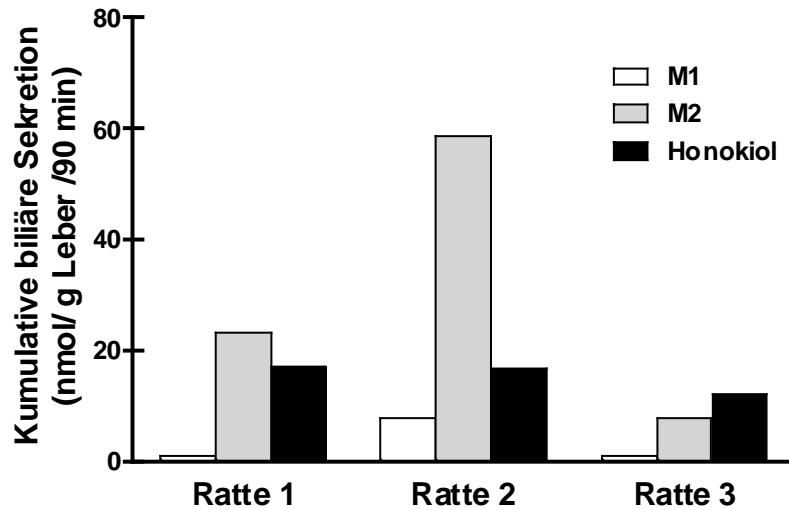


Abbildung 26: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol im Perfusat von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

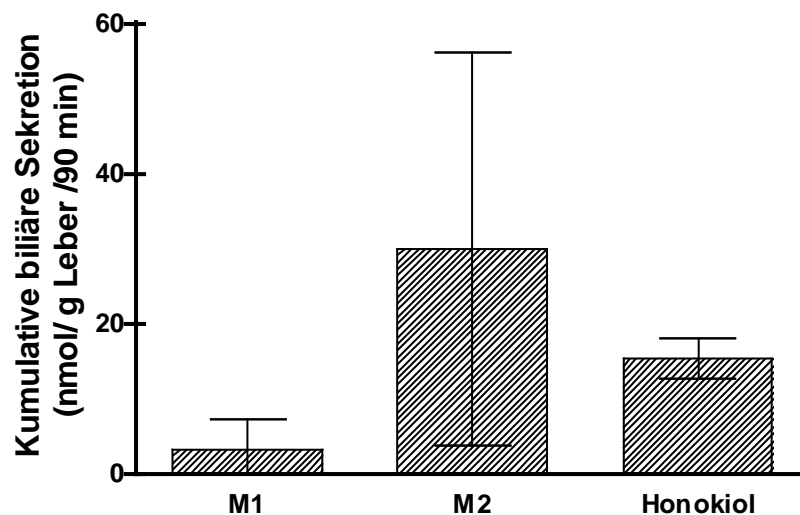


Abbildung 27: Gesamte kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol im Perfusat von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären Sekretion im Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in nmol/g Leber/90 Minuten

<b>Substanz</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>M1</b>	3,2	3,9
<b>M2</b>	29,9	26,2
<b>Honokiol</b>	15,3	2,7

#### ***4.4 Prozentuelle Verteilung der Metabolite in Galle und Perfusat***

Zur Ermittlung der Mengenanteile der einzelnen Metabolite bzw. aller Metabolite zusammen an der Gesamtsekretion in Galle und Perfusat, wurden die bei der HPLC-Analyse erhaltenen Flächen unter den Konzentration/Zeitkurven ( $\mu\text{g/ml}$ ) berechnet und graphisch dargestellt.

Folgende Abbildungen veranschaulichen die prozentuelle Verteilung von Honokiol und dessen Metabolite M1 und M2 in der Galle und im Perfusat dreier verschiedener Ratten.

Abbildung 28 zeigt, dass der Metabolit M2, in der ersten Ratte, mit 2,34 % mengenmäßig den größten Anteil in der Galle darstellt. Metabolit M1 zeigt in der Galle einen Wert von 0,8 % und Honokiol nur einen minimalen von 0,03 %.

Im Perfusat ist M2 mit einem Prozentsatz von 1,01% zu finden. M1 ist im Perfusat mit nur 0,04 % vertreten. Jedoch zeigt Honokiol, mit 0,74%, einen höheren Wert im Perfusat als in der Galle.

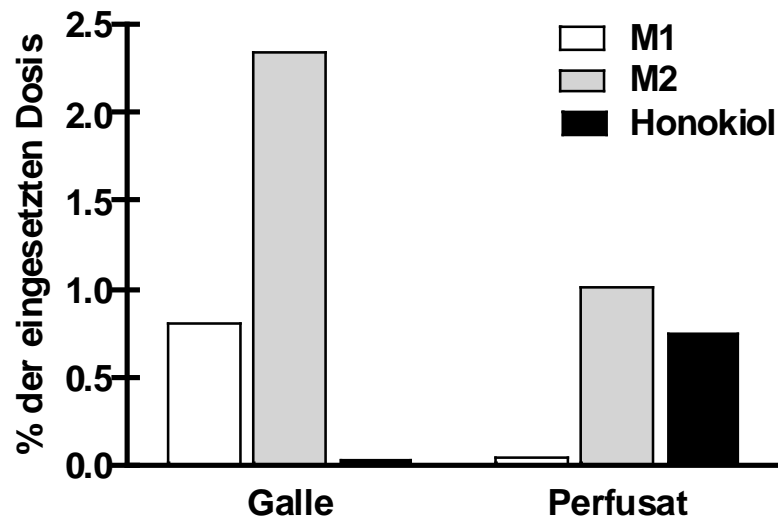


Abbildung 28: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 1

Tabelle 16: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 1

Medium	M1	M2	Honokiol
<b>Galle (%)</b>	0,8	2,34	0,03
<b>Perfusat (%)</b>	0,04	1,01	0,74

In der zweiten Ratte (Abbildung 29) wird ersichtlich, dass M2 mit 1,26 % und 1,81 % an der Gesamtsekretion in Galle bzw. Perfusat beteiligt ist. M1 zeigt Prozentsätze von 0,4 % in der Galle und 0,24 % im Perfusat. Honokiol zeigt, wie schon zuvor in der Galle der ersten Ratte, lediglich einen Wert von 0,03 %. Im Perfusat ist Honokiol mit 0,52% vertreten.

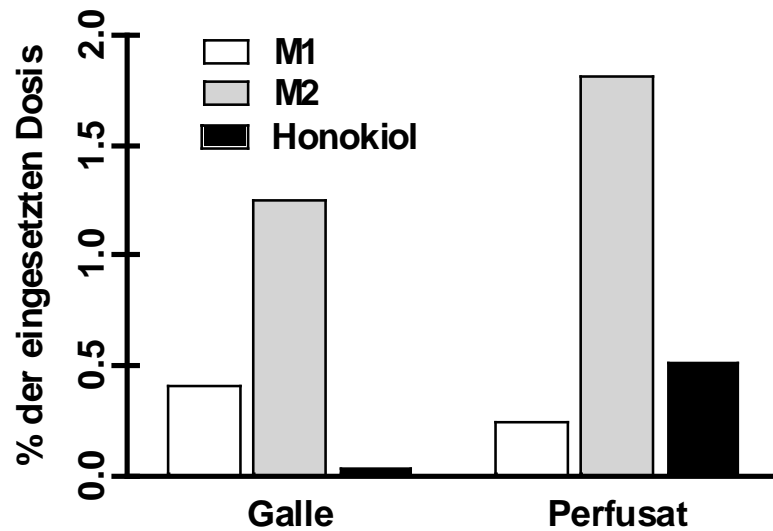


Abbildung 29: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 2

Tabelle 17: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 2

Medium	M1	M2	Honokiol
<b>Galle (%)</b>	0,4	1,26	0,03
<b>Perfusat (%)</b>	0,24	1,81	0,52

In der dritten Ratte (Abbildung 30) wird ersichtlich, dass M2 mit 1,15 % in der Galle den höchsten Wert darstellt. M1 und Honokiol zeigen einen Prozentsatz von 0,75 % und 0,02 % in der Galle. Im Perfusat wird M1 zu 0,05 %, M2 zu 0,35 % und Honokiol zu 0,55 % sezerniert.

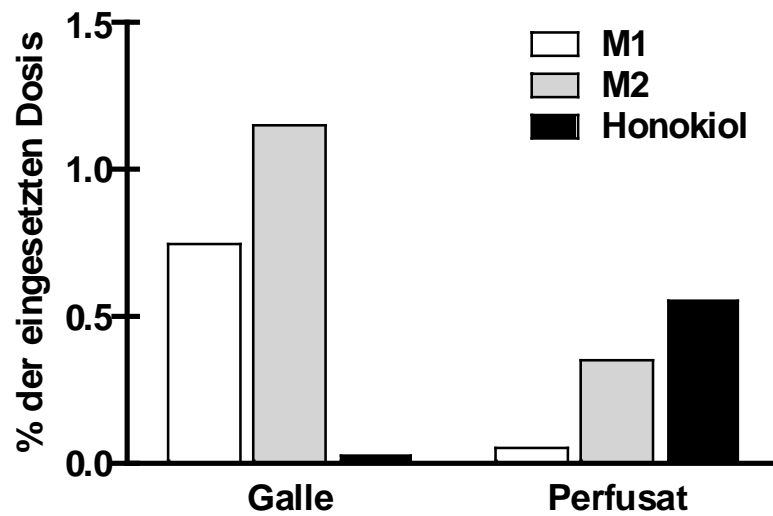


Abbildung 30: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 3

Tabelle 18: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 3

Medium	M1	M2	Honokiol
<b>Galle (%)</b>	0,75	1,15	0,02
<b>Perfusat (%)</b>	0,05	0,35	0,55

Abbildung 31 zeigt, dass M2, in allen drei Ratten, den größten Anteil an der Gesamtausscheidung in der Galle beiträgt. Das native Honokiol hingegen hat den geringsten Anteil.

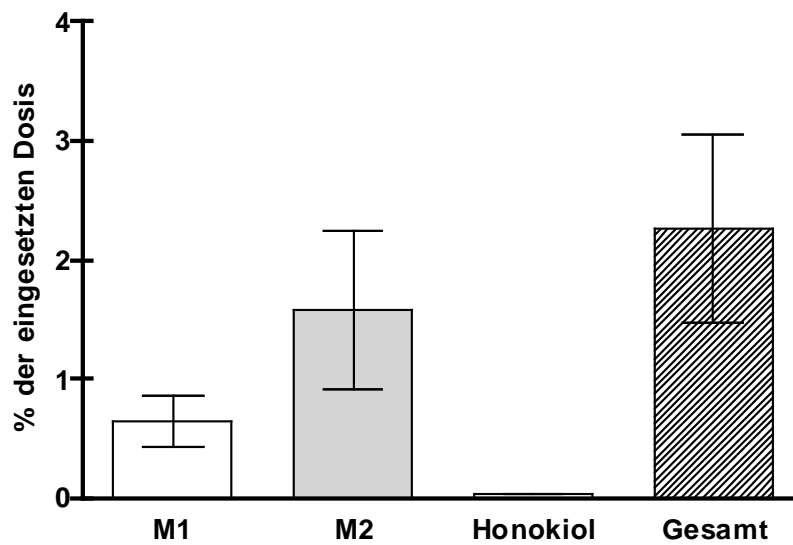


Abbildung 31: Mittelwerte der prozentuellen Anteile von M1, M2, Honokiol und der Gesamtsekretion in der Galle von Ratte 1, 2 und 3

Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentuellen Anteile von M1, M2 und Honokiol sowie der Gesamtsekretion in der Galle von Ratte 1,2 und 3 (n=3)

Medium: Galle		
Substanz	MW	SD
M1	0,65	0,22
M2	1,58	0,66
Honokiol	0,03	0,005
Gesamt	2,26	0,80

Im Perfusat (Abbildung 32) zeigt M2 ebenfalls den größten Anteil an der Gesamtausscheidung, in allen drei Ratten. Jedoch leistet hier M1 den geringsten Beitrag.

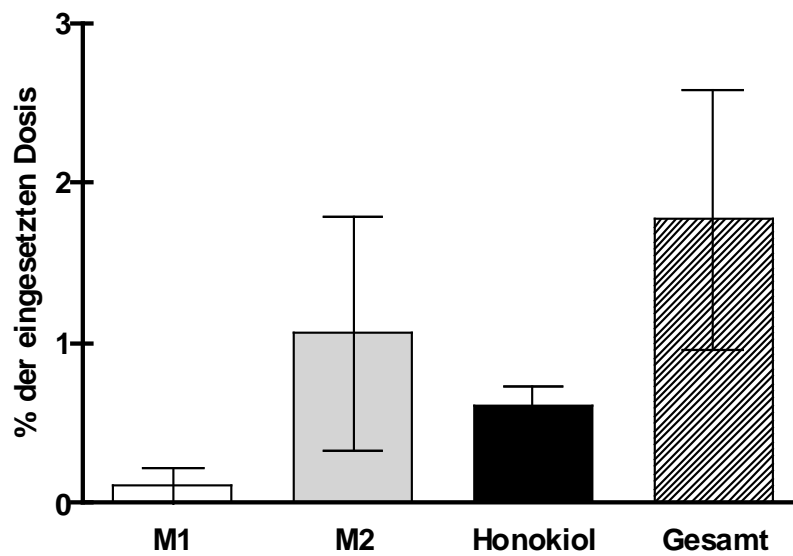


Abbildung 32: Mittelwerte der prozentuelle Anteile von M1, M2, Honokiol und der Gesamtsekretion im Perfusat in allen 3 Ratten

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentuellen Anteile von M1, M2 und Honokiol sowie der Gesamtsekretion im Perfusat in allen 3 Ratten (n=3)

<b>Medium: Perfusat</b>		
<b>Substanz</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>M1</b>	0,11	0,11
<b>M2</b>	1,06	0,73
<b>Honokiol</b>	0,60	0,12
<b>Gesamt</b>	1,77	0,81

## 5 DISKUSSION

Die bedeutendsten Inhaltsstoffe der Rinde von *Magnolia Officinalis* sind die beiden Neolignan-Isomere Honokiol und Magnolol. In der vorliegenden Diplomarbeit wurde näher auf den Metabolismus von Honokiol eingegangen. Drei Sprague Dawley-Ratten wurden hierfür mit einer 20 µmolaren Honokiollösung perfundiert, und danach die Galle und ein aliquoter Teil (10 ml) des Perfusates in fünf Minutenintervallen gesammelt, und deren Gehalte an Biotransformationsprodukten durch die HPLC-Analyse bestimmt.

Sowohl in den Galleproben als auch in den Perfusatproben wurden neben Honokiol zwei Metabolite detektiert, dabei handelt es sich um ein Mono- und Diglucuronid. (siehe Abbildung 33)

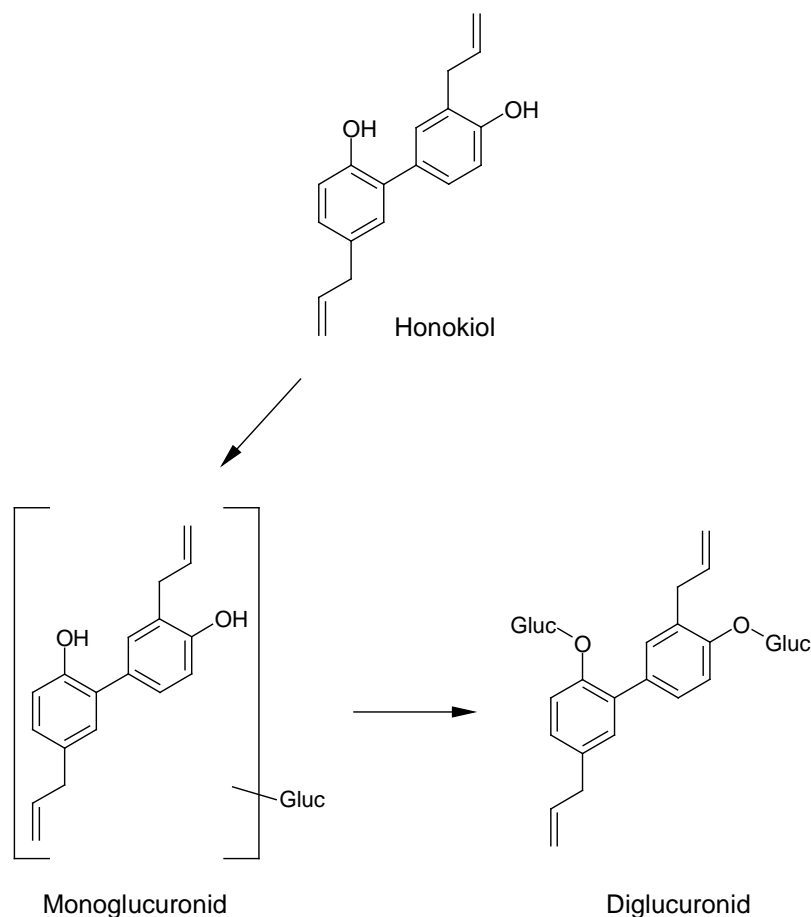


Abbildung 33: Metabolismus von Honokiol in Monoglucuronid und Diglucuronid

Eine Glucuronidierung wurde auch bei der strukturanalogen Verbindung Magnolol beobachtet. Hattori und seine Mitarbeiter fanden im Blut von Ratten nach peroraler Verabreichung von Magnolol sowohl natives Magnolol als auch Magnolol-2-O-Glucuronid. Im Fäzes und Urin der Versuchsratten wurden noch weitere Metabolite gefunden. Diese waren Dihydro- und Tetrahydromagnolol, sowie isomere Formen von Magnolol. Eine Untersuchung der Gallensekrete ergab weiters, dass ungefähr 50 % als Glucuronide ausgeschieden wurden, während die freie Form und ihre Metabolite nur einen geringen Anteil ausmachten. [9]

Eine weitere Studie zeigte ebenfalls Glucuronidierung als Hauptmetabolisierungsweg für Magnolol auf. Nach oraler Gabe von 20 mg/kg Magnolol konnte mittels Herzpunktion Blut von männlichen Sprague Dawley Ratten gesammelt werden, welches mit  $\beta$ -Glucuronidase inkubiert und einer HPLC-Analyse zugeführt wurde. Ein Anstieg der Peakfläche von Magnolol war die Folge und zeigte indirekt das Vorhandensein von Magnololglucuronoid auf. [10] In der oben beschriebenen Literatur wurden die entstandenen Glucuronide aus Magnolol zu fast 50 % über die Galle ausgeschieden, was im Einklang mit unseren Untersuchungen steht, wo ebenfalls die entstandenen Glucuronide von Honokiol vorwiegend über die Galle eliminiert wurden (siehe Abbildung 34). Demnach müssten diese Metabolite auch im Fäzes nachweisbar sein.

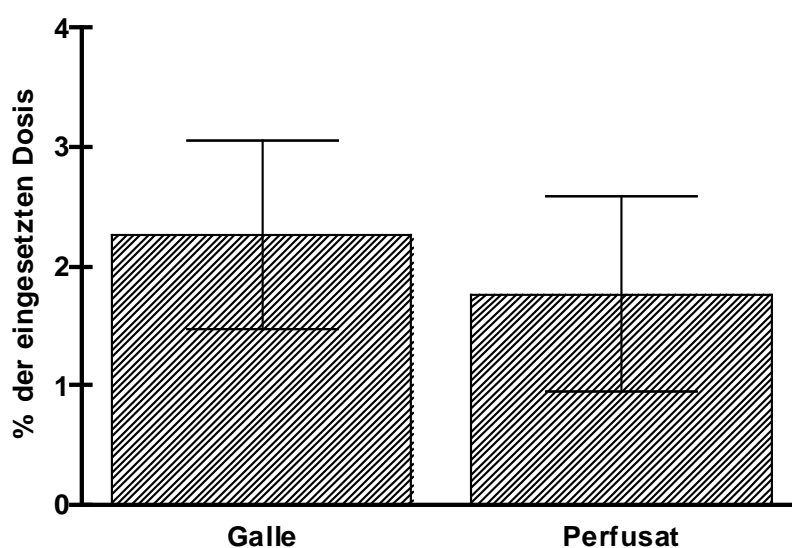


Abbildung 34: Prozentuelle Anteile aller Metabolite und Honokiol zusammen in Galle und Perfusat

Aufgrund der gefundenen Metabolite von Magnolol lässt sich sagen, dass Honokiol gemeinsam mit Arzneistoffen eingenommen werden kann die Cytochrom P450 Substrate darstellen. Da mehr als 90% aller im Handel befindlichen Arzneistoffe über das CYP-System metabolisiert werden sollte die Gefahr von Wechselwirkungen als gering anzusehen sein. Diese Erkenntnis ist besonders wichtig für Patienten, da Honokiol als Phytopharmakon nicht der Rezeptpflicht unterliegt.

Basierend auf unseren Daten sollte Honokiol in Patienten einer starken Metabolisierung unterliegen, wodurch die Bioverfügbarkeit als sehr gering anzusehen ist. Honokiol kann aufgrund seiner Lipophilie die Blut- Hirn- Schranke überwinden, jedoch wurde dies bei den Glucuroniden noch nicht untersucht. Aufgrund einer hohen Aktivität an Glucuronosyltransferasen in den Enterozyten dürfte Honokiol nicht nur in der Leber, sondern auch während der ersten Darmpassage glucuronidiert werden. Es darf weiters angenommen werden, dass Glucuronide von Honokiol auch in Patienten die Hauptmetaboliten darstellen, die ebenfalls im hohen Ausmaß, wie in unseren Rattenversuchen gezeigt, über die Galle ausgeschieden werden.

Ob die Glucuronide neben dem nativen Honokiol ebenfalls zur pharmakologischen Wirkung beitragen, kann derzeit nicht gesagt werden. Zudem fehlen von den Metaboliten Studien über die Verteilung im Blut und über die Passage der Blut- Hirn- Schranke. Eine Wirksamkeit der Metabolite könnte jedoch zumindest für jene von Magnolol gegeben sein, da Kuribara und Mitarbeiter trotz intensiver Metabolisierung von Magnolol, nach Verabreichung einer oralen Dosis von 0,2-2 mg/kg Honokiol in Mäusen eine anxiolytische Wirkung beobachten konnten. [11] Der anxiolytische Effekt wäre demnach nicht nur auf Honokiol, sondern auch auf dessen Biotransformationsprodukte zurückzuführen. [8,9] Weitere Studien über die pharmakologische Wirksamkeit von Honokiol und dessen Glucuronide sind geplant und sollten in nächster Zeit durchgeführt werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Rinde von *Magnolia Officinalis* wird bereits seit über 2000 Jahren in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt und ihr werden eine Reihe verschiedener Wirkungen zugeschrieben. Honokiol ist neben Magnolol einer der bedeutendsten Inhaltsstoffe, aufgrund seiner vielfältigen pharmakologischen Wirkungen, wobei die anxiolytische Wirkung von größtem Interesse ist. Für eine zukünftige therapeutische Anwendung von Honokiol ist es wichtig Kenntnisse über die Wirksamkeit im Körper zu erlangen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Diplomarbeit die Biotransformation bzw. Elimination von Honokiol mit Hilfe der isolierten, perfundierten Rattenleber in einem nahezu physiologischem Medium ohne Einfluß anderer Organe und Gewebe untersucht.

In den Galleproben und Perfusatproben konnten neben dem nativen Honokiol zwei Metabolite gefunden werden. Bei dem ersten Metabolit M1 handelt es sich um ein Diglucuronid und der zweite Metabolit M2 ist ein Monoglucuronid.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die Glucuronide überwiegend über die Galle ausgeschieden werden und ein etwas geringer Teil über das Perfusat.

Ob und in welchem Ausmaß Glucuronide pharmakologisch aktiv sind kann nicht gesagt werden. Basierend auf unserem Erlangen dürfte Honokiol jedoch im Patienten, nach peroraler Einnahme als Decoct bzw. als Pulver, in der Leber biotransformiert werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Sarker SD, Maruyama Y: The genus magnolia. medicinal and aromatic plants-industrial profiles. *Taylor & Francis*. **2002**; p 1, 3, 102-104
- 2 Watanabe K, Watanabe H, Goto Y, Yamaguchi M, Yamamoto N, Hagino K: Pharmacological properties of magnolol and honokiol extracted from magnolia officinalis: central depressant effects. *Planta Med*. **1983**; 49: 103-108
- 3 Patocka J, Jakl J, Strunecka A: Expectations of biologically active compounds of the genus magnolia in biomedicine. *Applied Biosc*. **2006**; 4: 171-178
- 4 Sohn EJ, Kim CS, Kim YS, Jung DH, Jang DS, Lee YM, Kim JS: Effects of magnolol (5,5'-diallyl-2,2'-dihydroxybiphenyl) on diabetic nephropathy in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Life Sci*. **2007**; 80: 468-475
- 5 Fujita M, Itokawa H, Sashida Y: [Studies on the components of magnolia obovata thumb. 3. occurrence of magnolol and honokiol in m. obovata and other allied plants]. *Yakugaku Zasshi*. **1973**; 93: 429-434
- 6 Nakazawa T, Yasuda T, Ohsawa K: Metabolites of orally administered magnolia officinalis extract in rats and man and its antidepressant-like effects in mice. *J. Pharm. Pharmacol*. **2003**; 55: 1583-1591
- 7 Paulus E, Yu-he D: Handbuch der traditionellen chinesischen Heilpflanzen. *Haug Verlag, Heidelberg*. **1987**; p 243
- 8 Hattori M, Sakamoto T, Endo Y, Kakiuchi N, Kobashi K, Mizuno T, Namba T: Metabolism of magnolol from magnoliae cortex: I. application of liquid chromatography- mass spectrometry to the analysis of metabolites of magnolol in rats. *Chem. Pharm. Bull*. **1984**; 32: 5010-5017

- 9 Hattori M, Endo Y, Takabe S, Kobashi K, Fukasaku N, Namba T: Metabolism of magnolol from magnoliae cortex: II. absorption, metabolism and excretion of [ring-<sup>14</sup>C] magnolol in rats. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**; 34: 157-167
- 10 Tsai TH, Chou CJ, Chen CF: Glucuronidation of magnolol assessed using HPLC/ fluorescence. *Planta Med.* **1995**; 61: 491-492
- 11 Maruyama Y, Kuribara H, Kishi E, Weintraub ST, Ito Y: Confirmation of the anxiolytic-like effect of dihydrohonokiol following behavioural and biochemical assessments. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**; 53: 721-725
- 12 Tsai TH, Chou CJ, Chen CF: Disposition of magnolol after intravenous bolus and infusion in rabbits. *Drug. Metab. Dispos.* **1995**; 22: 518-521
- 13 Kuribara H, Kishi E, Kimura M, Weintraub ST, Maruyama Y: Comparative assessment of the anxiolytic-like activities of honokiol and derivatives. *Pharm. Bio. Beh.* **2000**; 67: 597-601
- 14 Thews G, Mutschler E, Vaupel P: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.* **1999**; 5. Auflage: p 99
- 15 Kuribara H, Stavinoha WB, Maruyama Y: Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from magnolia bark, has no diazepam-like side-effects in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**; 51: 97-103
- 16 Liu B, Hattori N, Zhang NY, Wu B, Yang L, Kitagawa K, Xiong ZM, Irie T, Inagaki C: Anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, recovers amyloid  $\beta$  protein-induced neurotoxicity in cultered rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **2005**; 384: 44-47
- 17 Irie T, Miyamoto E, Kitagawa K, Maruyama Y, Inoue K, Inagaki C: An anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, inhibits ammonia-induced increases in the intracellular

- Cl<sup>-</sup> of cultured rat hippocampal neurons via GABA<sub>C</sub> receptors. *Neurosci. Lett.* **2001**; 312: 121-123
- 18 Lee J, Jung E, Park J, Jung K, Lee S, Hong S, Park J, Park E, Kim J, Park S, Park D: Anti-inflammatory effects of magnolol and honokiol are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEKK-1 in Nf-κB activation signaling. *Planta Med.* **2005**; 71: 338-343
- 19 Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY: Magnolol and honokiol isolated from magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1994**; 47: 549-553
- 20 Lin SY, Liu JD, Chang HC, Yeh SD, Lin CH, Lee WS: Magnolol suppresses proliferation of cultured human colon and liver cancer cells by inhibiting DNA synthesis and activating apoptosis. *J. Cell. Biochem.* **2002**; 84: 532-544
- 21 Ikeda K, Nagase H: Magnolol has the ability to induce apoptosis in tumor cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**; 25: 1546-1549
- 22 Ikeda K, Sakai Y, Nagase H: Inhibitory effect of magnolol on tumor metastasis in mice. *Phytotherapy Res.* **2003**; 17: 933-937
- 23 Teng CM, Yu SM, Chen CC, Huang YL, Huang TF: EDRF-release and Ca<sup>2+</sup>-channel blockade by magnolol, an antiplatelet agent isolated from chinese herb magnolia officinalis, in rat thoracic aorta. *Life Sci.* **1990**; 47: 1153-1161
- 24 Clark AM, El-Feraly FS, Li WS: Antimicrobial activity of phenolic constituents of magnolia grandiflora L. *J. Pharm. Sci.* **1981**; 70: 951-952
- 25 Ho KY, Tsai CC, Chen CP, Huang JS, Lin CC: Antimicrobial activity of honokiol and magnolol isolated from magnolia officinalis. *Phytother. Res.* **2001**; 15: 139-141

- 26 Bang KH, Kim YK, Min BS, Na MK, Rhee YH, Lee JP, Bae KH: Antifungal activity of magnolol and honokiol. *Arch. Pharm. Res.* **2000**; 23: 46-49
- 27 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.* **2001**; 8. Auflage: p 21-37
- 28 Löffler G: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.* **2003**; 5. Auflage: p 659

## 8 ABBILDUNGS – UND TABELLENVERZEICHNIS

### 8.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Magnolia Officinalis .....	2
Abbildung 2: Strukturen der bedeutendsten Inhaltsstoffe von Magnolia Officinalis	3
Abbildung 3: Magnolia Officinalis .....	4
Abbildung 4: Strukturformeln der Umwandlungsprodukte von Magnolol: Tetrahydromagnolol (M1), 5-(1-propen-1(E)-yl)-5'-propyl-2,2'- dihydroxybiphenyl (M2), 5-allyl-5'-propyl-2,2'-dihydroxybiphenyl (M3), Isomagnolol (M4), 5-allyl-5'-(1-propen1-(E)-yl)-2,2'-dihydroxy- biphenyl(M5), Magnolol (M6) .....	5
Abbildung 5: Metabolismus von Magnolol aus dem Wasserextrakt von Magnolia Officinalis .....	7
Abbildung 6: Honokiol- Analoga .....	9
Abbildung 7: HPLC Gradient für die Trennung von Honokiol und dessen Metabolite .....	23
Abbildung 8: Typisches Chromatogramm von Honokiol.....	29
Abbildung 9: Eichgerade für Honokiol .....	29
Abbildung 10: Chromatogramm einer Gallenprobe einer Sprague Dawley-Ratte (R1) nach 60 Minuten Perfusion.....	30
Abbildung 11: Chromatogramm einer Perfusatprobe einer Sprague Dawley-Ratte (R1) nach 60 Minuten Perfusion .....	30
Abbildung 12: Chromatogramm einer Kontrollgalle einer Sprague Dawley-Ratte (R1), versetzt mit Honokiol .....	31
Abbildung 13: Chromatogramm eines Kontrollperfusates einer Sprague Dawley- Ratte (R1), versetzt mit Honokiol.....	31
Abbildung 14: Massenspektrum des nativen Honokiols .....	33
Abbildung 15: Massenspektrum des Metaboliten M1 .....	33

Abbildung 16: Massenspektrum des Metaboliten M2 .....	34
Abbildung 17: Einfluß von Honokiol auf den Gallefluß von Sprague Dawley- Ratten .....	35
Abbildung 18: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit von Honokiol in die Galle von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten.....	37
Abbildung 19: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten .....	38
Abbildung 20: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten .....	39
Abbildung 21: Durchschnittlicher Efflux von Honokiol in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten.....	41
Abbildung 22: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M1 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten .....	42
Abbildung 23: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M2 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten .....	44
Abbildung 24: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol in der Galle von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten .....	45
Abbildung 25: Gesamte Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol in der Galle von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten.....	46
Abbildung 26: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol im Perfusat von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten.....	47
Abbildung 27: Gesamte kumulative biliäre Sekretion der Metabolite 1 und 2 und Honokiol im Perfusat von 3 Sprague Dawley- Ratten in einem Zeitintervall von 90 Minuten.....	47
Abbildung 28: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 1 .....	49

Abbildung 29: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 2 .....	50
Abbildung 30: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 3 .....	51
Abbildung 31: Mittelwerte der prozentuellen Anteile von M1, M2, Honokiol und der Gesamtsekretion in der Galle von Ratte 1, 2 und 3 .....	52
Abbildung 32: Mittelwerte der prozentuellen Anteile von M1, M2, Honokiol und der Gesamtsekretion im Perfusat in allen 3 Ratten .....	53
Abbildung 33: Metabolismus von Honokiol in Monoglucuronid und Diglucuronid...	54
Abbildung 34: Prozentuelle Anteile aller Metabolite und Honokiol zusammen in Galle und Perfusat.....	55

## **8.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Körper- und Lebergewicht der Versuchstiere in g.....	21
Tabelle 2: Zusammensetzung des Perfusionsmediums (Krebs-Henseleit- Puffer; KHP).....	21
Tabelle 3: Vorbereitung der Galle- und Perfusatproben.....	22
Tabelle 4: Parameter des HPLC Systems für Honokiol.....	23
Tabelle 5: Parameter für die Leberextraktion .....	26
Tabelle 6: Retentionszeiten von Honokiol und dessen Metabolite .....	28
Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen des Einfluß von Honokiol auf den Gallefluß von Sprague Dawley- Ratten (n=3).....	35
Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretions- geschwindigkeiten von Honokiol in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min .....	37
Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretions- geschwindigkeiten des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley-Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min .....	38
Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretions- geschwindigkeiten des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min .....	40

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretions- Geschwindigkeiten von Honokiol in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min .....	41
Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretions- geschwindigkeiten des Metaboliten M1 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min .....	43
Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretions- geschwindigkeiten des Metaboliten M2 in das Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min .....	44
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären Sekretion in der Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in nmol/g Leber/90 Minuten .....	46
Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären Sekretion im Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3) in nmol/g Leber/90 Minuten .....	48
Tabelle 16: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 1 .....	49
Tabelle 17: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 2 .....	50
Tabelle 18: Prozentuelle Verteilung der Metabolite M1 und M2 und Honokiol in Galle und Perfusat der Ratte 3 .....	51
Tabelle 19: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentuellen Anteile von, M1, M2 und Honokiol sowie der Gesamtsekretion in der Galle von Ratte 1,2 und 3 (n=3) .....	52
Tabelle 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentuellen Anteile von M1, M2 und Honokiol sowie der Gesamtsekretion im Perfusat in allen 3 Ratten (n=3) .....	53

## 9 ANHANG

Tabelle 1: Einzelwerte des Gallefluß ( $\mu\text{g/g Leber}\cdot\text{min}$ ) von Honokiol bei Sprague Dawley- Ratten (n=3; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit (min)</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>-5</b>	0,95	0,76	0,74	0,81	0,12
<b>0</b>	0,98	0,77	0,73	0,83	0,13
<b>5</b>	0,98	0,82	0,76	0,85	0,11
<b>10</b>	0,98	0,82	0,79	0,86	0,10
<b>15</b>	0,97	0,83	0,81	0,87	0,09
<b>20</b>	0,96	0,84	0,82	0,87	0,08
<b>25</b>	0,95	0,86	0,81	0,88	0,07
<b>30</b>	0,95	0,87	0,82	0,88	0,07
<b>35</b>	0,95	0,88	0,82	0,88	0,07
<b>40</b>	0,95	0,90	0,81	0,88	0,07
<b>45</b>	0,94	0,90	0,80	0,88	0,07
<b>50</b>	0,92	0,91	0,78	0,87	0,08
<b>55</b>	0,89	0,91	0,764	0,85	0,08
<b>60</b>	0,86	0,90	0,76	0,84	0,07
<b>65</b>	0,82	0,90	0,747	0,82	0,08
<b>70</b>	0,76	0,90	0,72	0,79	0,09
<b>75</b>	0,70	0,87	0,683	0,75	0,11
<b>80</b>	0,64	0,85	0,65	0,72	0,12
<b>85</b>	0,58	0,83	0,613	0,67	0,14
<b>90</b>	0,54	0,81	0,587	0,65	0,14

Tabelle 2: Einzelwerte der Sekretionsgeschwindigkeiten (pmol/g Leber.min) von Honokiol in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3, nach 70 min. n=2; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	5,9	0,0	0,0	2,0	3,4
<b>10</b>	6,6	4,9	4,5	5,3	1,1
<b>15</b>	7,9	6,9	6,4	7,0	0,8
<b>20</b>	9,0	9,0	8,1	8,7	0,6
<b>25</b>	9,3	9,9	8,1	9,1	1,0
<b>30</b>	9,4	11,9	9,3	10,2	1,5
<b>35</b>	10,2	10,5	10,8	10,5	0,3
<b>40</b>	10,1	13,8	11,5	11,8	1,9
<b>45</b>	10,0	13,1	13,3	12,1	1,8
<b>50</b>	9,7	14,0	9,4	11,0	2,6
<b>55</b>	7,7	19,1	9,4	12,1	6,2
<b>60</b>	10,5	17,4	11,3	13,1	3,8
<b>65</b>	7,9	16,4	10,6	11,6	4,3
<b>70</b>	8,9	15,7		12,3	4,9
<b>75</b>	7,6	13,9		10,7	4,4
<b>80</b>	5,8	13,2		9,5	5,2
<b>85</b>	5,1	14,3		9,7	6,5
<b>90</b>	7,6	12,4		10,0	3,4

Tabelle 3: Einzelwerte der Sekretionsgeschwindigkeiten (pmol/g Leber.min) des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3, nach 70 min. n=2; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	0,5	0,0	0,0	0,2	0,3
<b>10</b>	5,7	4,9	53,5	21,4	27,9
<b>15</b>	69,4	26,8	147,4	81,2	61,2
<b>20</b>	128,1	81,0	224,4	144,5	73,1
<b>25</b>	190,3	126,8	260,5	192,5	66,9
<b>30</b>	211,9	164,9	312,1	229,6	75,2
<b>35</b>	261,7	185,0	339,6	262,1	77,3
<b>40</b>	333,3	220,6	344,6	299,5	68,5
<b>45</b>	354,6	215,4	393,0	321,0	93,5
<b>50</b>	323,0	229,6	371,2	307,9	72,0
<b>55</b>	304,2	230,0	318,3	284,1	47,5
<b>60</b>	315,0	226,5	367,2	302,9	71,2
<b>65</b>	274,4	211,2	347,8	277,8	68,4
<b>70</b>	257,6	184,8		221,2	51,5
<b>75</b>	223,7	160,2		192,0	44,9
<b>80</b>	192,8	154,7		173,8	26,9
<b>85</b>	169,2	132,9		151,1	25,7
<b>90</b>	158,4	120,9		139,7	26,5

Tabelle 4: Einzelwerte der Sekretionsgeschwindigkeiten (pmol/g Leber.min) des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3, nach 70 min. n=2; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>10</b>	254,2	210,1	146,5	203,6	54,1
<b>15</b>	473,9	353,9	285,0	370,9	95,6
<b>20</b>	539,5	468,7	365,3	457,8	87,6
<b>25</b>	652,4	514,0	375,4	513,9	138,5
<b>30</b>	685,5	572,1	452,1	569,9	116,8
<b>35</b>	791,7	567,7	483,7	614,4	159,2
<b>40</b>	869,9	610,0	493,3	657,7	192,8
<b>45</b>	888,5	549,8	591,7	676,7	184,6
<b>50</b>	811,7	546,3	534,7	630,9	156,7
<b>55</b>	749,3	632,6	483,8	621,9	133,1
<b>60</b>	732,7	564,3	587,2	628,1	91,3
<b>65</b>	728,6	586,3	565,8	626,9	88,7
<b>70</b>	716,1	484,3		600,2	163,9
<b>75</b>	635,0	445,1		540,1	134,3
<b>80</b>	511,3	446,8		479,0	45,6
<b>85</b>	475,2	401,3		438,3	52,3
<b>90</b>	475,8	392,3		434,1	59,1

Tabelle 5: Einzelwerte der Sekretionsgeschwindigkeiten (pmol/g Leber.min) von Honokiol ins Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3, nach 75 min. n=2; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>10</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>15</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>20</b>	0,0	0,0	116,0	38,7	67,0
<b>25</b>	0,0	0,0	141,1	47,0	81,5
<b>30</b>	219,4	0,0	220,4	146,6	127,0
<b>35</b>	274,2	128,9	206,1	203,1	72,7
<b>40</b>	329,1	299,0	217,5	281,9	57,7
<b>45</b>	365,6	319,6	214,1	299,8	77,7
<b>50</b>	274,2	323,1	274,1	290,5	28,3
<b>55</b>	329,1	317,7	276,2	307,5	27,9
<b>60</b>	219,4	310,5	312,5	280,8	53,2
<b>65</b>	237,6	305,6	290,7	278,0	35,7
<b>70</b>	292,5	293,4	333,5	306,5	23,5
<b>75</b>	219,4	321,7		270,6	72,4
<b>80</b>	237,6	285,4		261,5	33,8
<b>85</b>	255,9	282,8		269,3	19,0
<b>90</b>	292,5	306,8		299,7	10,1

Tabelle 6: Einzelwerte der Sekretionsgeschwindigkeiten (pmol/g Leber.min) des Metaboliten M1 ins Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3, nach 75 min. n=2; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>10</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>15</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>20</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>25</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>30</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>35</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>40</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>45</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>50</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>55</b>	0,0	0,0	28,1	9,4	16,2
<b>60</b>	0,0	157,0	56,5	71,2	79,5
<b>65</b>	0,0	119,5	80,4	66,6	60,9
<b>70</b>	0,0	192,6	80,7	91,1	96,7
<b>75</b>	0,0	234,3		117,1	165,6
<b>80</b>	59,1	360,9		210,0	213,5
<b>85</b>	69,0	307,7		188,4	168,8
<b>90</b>	83,6	359,8		221,7	195,3

Tabelle 7: Einzelwerte der Sekretionsgeschwindigkeiten (pmol/g Leber.min) des Metaboliten M2 ins Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3, nach 75 min. n=2; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Zeit [min]</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>0</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>5</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>10</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>15</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>20</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>25</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>30</b>	69,9	156,3	0,0	75,4	78,3
<b>35</b>	58,1	204,9	59,4	107,5	84,4
<b>40</b>	76,2	357,7	80,9	171,6	161,2
<b>45</b>	171,5	337,4	109,3	206,1	117,9
<b>50</b>	220,0	475,5	161,8	285,8	166,9
<b>55</b>	284,8	603,4	219,0	369,1	205,6
<b>60</b>	247,6	1044,0	333,3	541,7	437,2
<b>65</b>	375,1	1012,6	400,8	596,2	360,9
<b>70</b>	518,1	1224,8	349,9	697,6	464,3
<b>75</b>	636,2	1451,1		1043,6	576,2
<b>80</b>	705,5	1678,5		1192,0	688,0
<b>85</b>	789,8	2067,0		1428,4	903,1
<b>90</b>	1004,1	2285,2		1644,6	905,9

Tabelle 8: Einzelwerte der kumulativen biliären Sekretion (nmol/g Leber/90 Minuten) in der Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

Substanz	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	MW	SD
<b>M1</b>	18,5	13,1	16,5	16,0	2,7
<b>M2</b>	53,8	40,8	25,4	40,0	14,2
<b>Honokiol</b>	0,7	1,1	0,5	0,8	0,3

Tabelle 9: Einzelwerte der kumulativen biliären Sekretion (nmol/g Leber/90 Minuten) im Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

Substanz	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	MW	SD
<b>M 1</b>	0,9	7,8	1,0	3,2	3,9
<b>M 2</b>	23,3	58,8	7,7	29,9	26,2
<b>Honokiol</b>	17,0	16,7	12,2	15,3	2,7

Tabelle 10: Einzelwerte der prozentuellen Anteile der Metabolite und Honokiol sowie die Prozentanteile an der Gesamtsekretion in die Galle von Sprague Dawley- Ratten (n=3; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

Substanz	Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	MW	SD
<b>M 1</b>	0,80	0,40	0,75	0,65	0,22
<b>M 2</b>	2,34	1,26	1,15	1,58	0,66
<b>Honokiol</b>	0,03	0,03	0,02	0,03	0,005
<b>Gesamt</b>	3,18	1,69	1,92	2,26	0,80

Tabelle 11: Einzelwerte der prozentuellen Anteile der Metabolite und Honokiol sowie die Prozentanteile an der Gesamtsekretion ins Perfusat von Sprague Dawley- Ratten (n=3; MW= Mittelwert; SD= Standardabweichung)

<b>Substanz</b>	<b>Ratte 1</b>	<b>Ratte 2</b>	<b>Ratte 3</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>
<b>M 1</b>	0,04	0,24	0,05	0,11	0,11
<b>M 2</b>	1,01	1,81	0,35	1,06	0,73
<b>Honokiol</b>	0,74	0,52	0,55	0,60	0,12
<b>Gesamt</b>	1,79	2,57	0,95	1,77	0,81

## 10 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name:	Nicole Wagner
Geburtsdatum:	16.05.1982
Geburtsort:	Wien
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Eltern:	Herbert und Roswitha Wagner

### Ausbildung:

1988 – 1992	Volksschule, Wien
1992 – 2000	Gymnasium, Wien
06.06.2000	Reifeprüfung
seit Oktober 2000	Studium der Pharmazie an der Universität Wien