

## 4. Auswertung und Diskussion

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch chronische Hyperglykämie mit Störungen im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel, welche aus Defekten der Insulinsekretion, Insulinwirkung oder beiden resultiert, gekennzeichnet ist. Die Klassifizierung des Diabetes mellitus erfolgt nach ätiologischen Gesichtspunkten. Typ 1 umfasst dabei die Fälle mit vorangegangener  $\beta$ -Zell-Zerstörung. Typ 2 ist gekennzeichnet durch Störungen der Insulinwirkung und/oder der Insulinsekretion. Eine dritte Gruppe umfasst die Fälle, die auf einen spezifischen Defekt, wie genetische Störungen oder Erkrankungen des exokrinen Pankreas, zurückzuführen sind.

Die letzte WHO-Schätzung von 2002 bezifferte die weltweit von Diabetes betroffenen Erwachsenen mit 173 Millionen. Circa zwei Drittel dieser Betroffenen leben in Entwicklungsländern. Diabetes mellitus kann also nicht länger als Wohlstandserkrankung der Industrieländer angesehen werden. Weitere Zahlen belegen, dass vom Typ 2 Diabetes mellitus zunehmend Kinder und Jugendliche betroffen sind (WHO, 2003).

Der Typ 2 Diabetes mellitus tritt häufig begleitet durch andere Symptome des Formenkreises Metabolisches Syndrom auf. Die Behandlung des Diabetes hat daher neben der symptomatischen Blutzuckerregulierung auch die Behandlung der weiteren Faktoren zum Ziel.

Bei der oralen antidiabetischen Therapie stehen verschiedene Therapeutika mit unterschiedlichen Angriffspunkten zur Verfügung.

Eine Klasse oraler Antidiabetika wird durch die  $\alpha$ -Glukosidase-Hemmstoffe repräsentiert. Unter dem Begriff Glukosidase (EC 3.2.1) werden die Enzyme zusammengefasst, die durch Spaltung O- und S-glykosidischer Bindungen wirken. In diese Gruppe gehört auch die  $\alpha$ -Amylase (EC 3.2.1.1). Sie spaltet 1,4- $\alpha$ -D-glykosidische Bindungen in Polysacchariden, die drei oder mehr 1,4- $\alpha$ -verknüpfte D-Glukose-Einheiten enthalten durch Endohydrolyse. Die  $\alpha$ -Amylase ist ein typisches Sekretionsenzym. Als Pankreasamylase wird sie intrazellulär in den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der Azinuszellen des Pankreas synthetisiert und in aktiver Form in den Verdauungstrakt abgeschieden. Dort erfolgt die Spaltung der Polysaccharide. Durch Hemmung des Enzyms ist auch der Abbau der langkettigen 1,4- $\alpha$ -glykosidisch verknüpften Kohlenhydrate reduziert. Infolgedessen stehen weniger Monosaccharide zur Resorption zur Verfügung, ein Blutzuckeranstieg unterbleibt.

Zugelassen zur Therapie mit diesem Wirkmechanismus sind in Deutschland Acarbose (Glucobay®) und Miglitol (Diastabol®).

## 4.1 Aufbau der Screening-Methode

Zur Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität sind verschiedene Methoden bekannt. In den letzten Jahren setzten sich jedoch mehr und mehr kinetische Bestimmungsmethoden unter Verwendung von 4-Nitrophenyl- bzw. 2-Chloro-4-nitrophenylmaltooligosacchariden als chromogene Substrate durch. Unter Einwirkung des Enzyms wird die Zuckerkette abgespalten, die steigende Absorption des freigesetzten p-Nitrophenols kann bei 405 nm kontinuierlich gemessen werden. Bisher wurden diese Bestimmungen zur Diagnose der Pankreatitis genutzt. Eine Adaptation und Anpassung der Messmethode in der vorliegenden Arbeit machte es möglich, in kurzer Zeit verschiedene Pflanzenextrakte und Reinstoffe auf ihre mögliche Fähigkeit, die  $\alpha$ -Amylase zu hemmen, zu untersuchen. Während die IFCC-Methode (IFCC, 1999) die Verwendung von 2-Chloro-4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltotriosid als chromogenes Substrat vorschlägt, wurde das Testmodell zunächst mit p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltoheptaosid (PNPG7) aufgebaut und, nach Kontrolle der Kompatibilität, aus Kostengründen mit p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltopentaosid (PNPG5) weiter bearbeitet. Die Ermittlung des geeigneten Substrat-Enzym-Verhältnisses, welches über den Meßzeitraum eine hohe Linearität aufweisen sollte, war nach der Festlegung der Meßwellenlänge der wichtigste Schritt. Zahlreiche Versuche waren hierfür notwendig. Eine endgültige Festlegung der Parameter erfolgte, als das Testsystem ohne Inhibitorzusatz eine hohe Linearität mit ausgeprägtem Anstieg zeigte, der sich durch die Positivkontrolle konzentrationsabhängig senken ließ. Die Übertragung der Methode auf das Substrat PNPG5 erforderte eine weitere Optimierung der Substratkonzentration. Vermutlich wurde aufgrund der kürzeren Zuckerkette des neuen Substrats die Sättigungskonzentration eher erreicht, was eine Erhöhung der Substratkonzentration bei gleichbleibender Enzymmenge erforderlich machte. Als Puffer wurde HEPES gewählt. Diesem wurde zur Aktivierung der  $\alpha$ -Amylase Chlorid und als Co-Faktor Calcium zugesetzt. Der Calcium-Zusatz ist nicht essentiell, schützt die Amylase aber vor möglichen Komplexbildnern. Ein Austausch durch Magnesium ist möglich (Lorentz, 2000). Um im verwendeten Testmodell die  $\alpha$ -Amylase Hemmung zu quantifizieren, wurde Acarbose als Positivkontrolle in den Untersuchungen mitgeführt. Die  $IC_{50}$  von Acarbose im verwendeten Testmodell wurde mit 0,023 mM bestimmt.

Das Mitführen von Kontrollen bei jeder Messung garantierte die exakte Bestimmung der Enzymaktivität.

## 4.2 Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Aktivität der $\alpha$ -Amylase

### 4.2.1 Pflanzenscreening

Für das Screening wurden Pflanzen aus Europa und Afrika ausgewählt. Von den 67 gescreenten Drogen wurden verschiedene Pflanzenteile (Kraut, Blätter, Wurzeln, Rinde, Früchte) eingesetzt, um ein möglichst breites Spektrum von Inhaltsstoffen bei der Extraktion zu erfassen.

Die Zahl der in Afrika traditionell zur Behandlung des Diabetes eingesetzten Pflanzen ist sehr groß. Auch die Verbreitung der Anwendung dieser Drogen in der Bevölkerung ist sehr hoch. So werden beispielsweise *Annona senegalensis* Pers., *Balanites aegyptiaca* (L.) Del., *Holarrhena floribunda* G.Don, *Mitragyna inermis* (Willd.) Kuntze, *Securidaca longepedunculata* Fresen. und *Tamarindus indica* L. traditionell in der Diabetes-Therapie durch Heilkundige verwendet. Ihre Effektivität wurde teilweise auch im Tierexperiment bestätigt, was die Seriosität der Anwendung und die Erfahrung der Heilkundigen bestätigt (Neuwinger, 2004). Trotzdem sollten weitere Untersuchungen zu diesen traditionell genutzten Pflanzen erfolgen, die neben ihrer Wirksamkeit auch ihren Wirkmechanismus und nicht zuletzt ihre Verträglichkeit bzw. ihr toxisches Potential berücksichtigen.

Die übrigen für das Screening eingesetzten Pflanzen waren überwiegend solche, die volksmedizinisch in Diabetikertees bzw. als Nahrungsergänzungsmittel Verwendung finden (Swanston-Flatt et al. 1991, Yeh et al. 2003). Beim Screening der wässrigen Extrakte dieser Pflanzen konnte festgestellt werden, dass die Beeinflussung der Enzymaktivität unterschiedlich stark ausgeprägt war. Alle Extrakte wurden nach gleicher Vorschrift gewonnen. Durch Eindampfen wurden die Extraktgehalte bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass ein hoher Extraktgehalt nicht zwangsläufig zu einer ausgeprägten Enzymhemmung führte. Extrakte von Drogen, die Kaffeesäurederivate und Flavonoide in ihrem Inhaltsstoffspektrum aufweisen, erwiesen sich als relativ potent hinsichtlich ihrer Enzymhemmung. Die Hemmung scheint hier mit dem Gehalt dieser Verbindungen zu korrelieren. So konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität durch Melisse von der Konzentration der Rosmarinsäure abhängt (McCue & Shetty, 2004).

In der Arbeit getestete Lamiaceae, traditionelle Labiatengerbstoffdrogen, zeigten teilweise ausgeprägte Hemmeffekte gegenüber  $\alpha$ -Amylase. So konnte eine ca. 60%ige Enzymhemmung durch Rosmarinblätterextrakt erzielt werden. Die Hemmung durch

Melissenblätter lag bei ca. 50%. Dagegen hemmten vergleichbare Mengen von Salbei das Enzym zu lediglich 15%. Der Gehalt an Hydroxyzimtsäure-Derivaten in diesen Pflanzen wird in der Literatur mit ca. 8% (Rosmarinblätter) bzw. 3-5% bei Salbei- und Melissenblättern benannt (Brand & Stahl-Biskup in Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis). Trotz des ähnlichen Gehaltes an Hydroxyzimtsäuren ist der Unterschied in der Enzymhemmung zwischen Melissen- und Salbeiblättern doch beträchtlich. Möglicherweise sind weitere Inhaltsstoffe an der Gesamtwirkung beteiligt bzw. scheint die Zusammensetzung, die synergistische Wirkungen hervorrufen kann, entscheidend zu sein. Eine früher beschriebene blutzuckersenkende Aktivität von Salbei (Perfumi et al., 1991) konnte in dieser Arbeit nicht über eine Amylase-Hemmung erklärt werden. Auch bei Streptozotocin-induzierten Diabetes-Mäusen konnte ein blutzuckersenkender Effekt durch Salbei nicht festgestellt werden (Swanston-Flatt et al., 1989).

Bemerkenswert ist der große Unterschied zwischen verschiedenen Extrakten der gleichen Pflanze. So zeigt der Pufferextrakt von *Galega officinalis*, der bei Raumtemperatur gewonnen wurde, kaum einen hemmenden Effekt auf die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität. Dagegen hemmte der Heißpufferextrakt, der zusätzlich angefertigt wurde, das Enzym zu ca. 35%. Auch die Geißraute (*Galega officinalis*) gehört zu den in der Literatur beschriebenen pflanzlichen Antidiabetika, allerdings wurde ihr hypoglykämischer Effekt bisher auf das enthaltene Galegin, ein dem Metformin verwandtes Isoamylguanidin, zurückgeführt (Witters, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte nun auch ein  $\alpha$ -Amylase-hemmender Effekt eines Heißpufferextraktes dieser Pflanze nachgewiesen werden. Auch die British Herbal Pharmacopoeia benennt die Geißraute als mögliche Ergänzung in der Diabetes-Therapie (Swanston-Flatt et al., 1991). Von den getesteten Pflanzen werden neben *Galega officinalis* einige als traditionelle Nahrungsergänzungsmittel in Großbritannien genutzt: *Taraxacum officinale*, *Salvia officinale*, *Phaseolus vulgaris*, *Pyrus malus*. Während die für die Hemmung der Enzymaktivität verantwortlichen Inhaltsstoffe oftmals nicht bekannt sind, konnte mit Phaseolamin bereits frühzeitig ein spezifischer  $\alpha$ -Amylase-Hemmstoff aus *Phaseolus vulgaris* isoliert werden (Marshall & Lauda, 1975).

Ein blutzuckersenkender Effekt von *Camellia sinensis* konnte in früheren Studien tierexperimentell festgestellt werden (Gomes et al., 1995). Der getestete Trockenextrakt zeigte eine ca. 65%ige Hemmung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität. Bohnenschalen sind relativ oft Bestandteil sogenannter Diabetiker-Tees, auch hier ließ sich ein hemmender Effekt auf die  $\alpha$ -

Amylase-Aktivität feststellen. Mit  $\alpha$ -AI wurde ein weiterer Inhibitor aus *Phaseolus vulgaris* isoliert. Dabei handelt es sich um einen spezifischen, Lektin-artigen Inhibitor, ein 56-kDa Glykoprotein-Dimer (Koukiekolo et al., 1999; Le Berre-Anton et al., 2000).

Über die antidiabetische Wirksamkeit von *Trigonella foenum-graecum* gibt es zahlreiche Berichte (Shane-McWhorter, 2001; Yeh et al., 2003; Gad et al., 2006), eine Wirkung gegenüber  $\alpha$ -Amylase konnte nicht nachgewiesen werden. Das gleiche gilt für Zimtrinde, deren antidiabetische Potenz durch andere Mechanismen vermittelt werden soll (Khan et al., 2003). Maulbeerblätter werden in der chinesischen Medizin traditionell eingesetzt, um Diabetes vorzubeugen oder die Erkrankung zu behandeln (Asano et al., 2001). Auch die Weiße Maulbeere soll eine antidiabetische Wirkung aufweisen (Lemus et al. 1999), die  $\alpha$ -Amylase-Aktivität wurde nicht beeinflusst, so dass der butzuckersenkende Effekt wohl über andere Mechanismen erfolgen muß. Der Fruchtsaft der roten Maulbeere zeigte dagegen eine moderate Hemmwirkung. Hier könnten phenolische Inhaltsstoffe, wie Proanthocyanidine, die Hemmwirkung vermitteln. Auch Hauhechelwurzel zeigte keine Hemmaktivität gegenüber der  $\alpha$ -Amylase.

Als besonders aktiv erwiesen sich Presssäfte aus Apfel und Birne, die das Enzym nahezu 100%ig hemmten. Welche Inhaltsstoffe für den Effekt verantwortlich sind, ist noch nicht klar. Ein Nachweis hemmender Aktivität auf die  $\alpha$ -Amylase durch Apfelpolyphenole wurde durch Yanagida et al. (2000) gezeigt. Auch der kommerziell erhältliche Blütenknospenpresssaft der Artischocke hemmte das Enzym zu über 90%.

Als sich zeigte, dass verschiedene Artischockenzubereitungen unterschiedliche Wirkungen auf die Enzymaktivität ausübten, wurde über eine zusätzliche fraktionierte Extraktion versucht, biologisch aktive Fraktionen zu bestimmen. Eine Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte nach jedem Extraktionsschritt. Es konnte somit festgestellt werden, dass bei Hemmungen von 63,3% durch 25  $\mu$ l ethanolischen Extrakt bzw. von 37,9% durch 25  $\mu$ l Pufferextrakt die wirksamen Komponenten in der ethanolischen bzw. der wässrigen Fraktion anzutreffen sind. Die vergleichsweise hohe Aktivität des Pufferextraktes nach Gewinnung des ethanolischen Extrakts zeigte, dass aktive Substanzen eine ausgeprägte Hydrophilie aufweisen müssen.

## 4.2.2 Kurzportrait der Artischocke

Die Artischocke zählt heutzutage zu den wichtigen Arzneipflanzen. Bereits in der Antike war sie bekannt, wurde jedoch damals kaum medizinisch verwendet, sondern war als seltenes Gemüse eher den begüterten Kreisen vorbehalten. Allerdings waren ihre verdauungsfördernden Eigenschaften bereits bekannt.

### 4.2.2.1 Botanik

Wurden bislang die Artischocke (*Cynara scolymus* L.) und die Kardone (*Cynara cardunculus* L.) voneinander unterschieden, werden heute nach der botanisch-taxonomischen Revision der Gattung *Cynara* beide Spezies zu der neuen Art *Cynara cardunculus* L. subsp. *flavescens* Winkl. vereint und lediglich als zwei Kulturformen, „Arzneiartischocke“ bzw. „Gemüseartischocke“, behandelt (Brand, 1999; Mayer, 2003). Die Artischocke gehört zur Familie der Asteraceae. Die Gattung *Cynara* ist gekennzeichnet durch ausdauernde Kräuter mit distelartigem Habitus. Die Arzneiartischocke ist nur als Kulturform bekannt. Sie ist eine krautige Pflanze mit kurzem, ausdauerndem Wurzelstock. Der Stengel ist bis 2 m hoch. Die Laubblätter sind ein- bis zweifach fiederschnittig, weich, oberseits hellgrün und unbehaart, unterseits graufilzig behaart. Die einzelnen Blütenköpfe sind mit einem Durchmesser von 5 cm recht groß. Der Blütenboden ist fleischig. Ebenso die Hüllkelchblätter, die an der Spitze zu einem abgeflachten Zipfel auslaufen. Die Kronblätter sind blau, lila oder weißlich. Die röhrenförmigen Einzelblüten sind zwittrig. Die Achänen sind braun gesprenkelt und weisen einen 40 mm langen Pappus auf. Die Aufbereitungsmonographie der Kommission E gibt für die arzneiliche Verwendung sowohl die frischen als auch die getrockneten Blätter an (Brand, 1990; Brand in: Hagers Handbuch, 1992).



Abb. 54: *Cynara cardunculus* L. subsp. *flavescens* Winkl. (Honermeier et al., 2001)

#### 4.2.2.2 Inhaltsstoffe

Pharmakognostisch und therapeutisch relevante polyphenolische Inhaltsstoffklassen sind die Caffeoylchinasäuren, Flavonoide und Sesquiterpenlactone. So konnten aus den Blättern der Artischocke folgende Substanzen isoliert werden: Apigenin, Luteolin, Luteolin-4-glucosid, Cynarosid (Luteolin-7-glucosid), Scolymosid (Luteolin-7-Rutinosid), Cosmosid, Quercetin, Rutin, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Isochlorogensäure, Luteolin-7-gentiobiosid, Scopoletin, Hesperetin, Hesperidin, Esculetin-6-O-glucosid (Aesculin), Narirutin (Hinou et al., 1989; Brand, 1990; Schütz et al., 2004; Wang et al., 2003; Llorach et al. 2002; Fritsche et al., 2002). Cynarin ist in der frischen Droge kaum vorhanden, sondern entsteht beim Kochen in wässrigem Medium durch Hydrolyse und Umesterung aus 1,3 Di-O-Caffeoylchinasäure (Brand, 1990).



#### 4.2.2.3 Arzneiliche Verwendung

Die Gemüseartischocke war bereits unter Plinius bekannt. Auch Galen von Pergamon erwähnt sie als Lebensmittel. Dioskorides beschreibt eine distelartige Pflanze unter dem Kapitel „Skolymus“, allerdings ist noch nicht geklärt, ob die Artischocke gemeint ist. Avicenna beschreibt die Verwendung der Artischocke als Diuretikum, Aphrodisiakum und zu äußerlichen Anwendungen bei Schwellungen, Wunden und Geschwüren. Im „New Kreüterbuch“ von Leonhart Fuchs (1543) ist die Artischocke dokumentiert (Mayer, 2003).

Heutzutage werden Zubereitungen aus Artischocke allgemein eingesetzt bei dyspeptischen Beschwerden. Hier beruht die Wirkung im Wesentlichen auf einer Steigerung der Choleresse. Die choleretische und anticholestatische Wirkung von wässrigem Artischockenblattextrakt konnte im Tierexperiment gezeigt werden. Des Weiteren steht die Langzeittherapie von Fettstoffwechselstörungen im Vordergrund. Darüber hinaus zeigen Artischocken-Extrakte die Fähigkeit, die hepatische Cholesterolsynthese zu hemmen. Ebenso soll eine Hemmung der plaquebildenden oxidierten LDL bewirkt werden (Wegener & Schmidt, 1995; Gebhardt, 2002; Gebhardt, 1998; Matuschowski et al., 2005; *Cynarae folium* in: ESCOP-Monographs).

#### 4.2.2.4 Analytik

Für die Analytik der Artischockenextrakte wurden neben der Droge auch der Presssaft und die Trockenextrakte der Firma Lichtwer Pharma AG eingesetzt. Analysenzertifikate dieser Extrakte benannten den Gesamtflavonoidgehalt und den Gehalt an Caffeoylchinasäuren. Da die Droge selbst sehr gut untersucht ist, war das nachzuweisende Inhaltsstoffspektrum bekannt. Mit den Flavonoiden und den Kaffeesäurederivaten gab es hier zwei große Inhaltsstoffklassen, die im Einzelnen nachgewiesen werden sollten. Für die Identifizierung und Quantifizierung dieser Substanzen werden verschiedene HPLC-Methoden beschrieben (Schütz et al., 2004; Wang et al., 2003). Die Modifikation dieser Methoden führte jedoch nicht zu einer befriedigenden Trennung der strukturell sehr ähnlichen Komponenten. Infolgedessen wurde versucht, die Einzelkomponenten dünnschichtchromatografisch zu trennen. Erste Versuche mit Kieselgel 60 Platten mit zur *Cynara*-Analytik etablierten Laufmitteln (Wagner et al., 1983) ergaben auch hier keine genügende Trennung. Erst der Einsatz von RP18-Platten führte zu einer deutlichen Trennung der Komponenten. Als mobile Phase wurde dabei das Gemisch eingesetzt, das als Gradient bei der HPLC die höchste

Trennschärfe besaß.

Durch die Nutzung des DC-Scann-Systems TIDAS-TLC 2010 Diode Array Scanner konnte die genaue Laufhöhe der Banden der untersuchten Extrakte und der Vergleichssubstanzen bestimmt werden. Da jedoch die polyphenolischen Substanzen ähnliche UV-Spektren aufweisen, war die Zuordnung allein über diese Detektion nicht möglich. Die zusätzliche Detektion mit Naturstoffreagenz/PEG erleichterte die Zuweisung der Extraktbanden zu denen der Vergleichssubstanzen. Da nicht für alle bekannten Inhaltsstoffe der Artischocke Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, war die exakte Identifizierung einiger Banden nicht möglich.

Die auf diese Weise nachgewiesenen Substanzen wurden anschließend auf ihre biologische Aktivität untersucht.

Da die Charakterisierung der bekannten Inhaltsstoffe von *Cynarae herba* über die zwei verwendeten Methoden eindeutig gelang, wurde auf weitere Bestimmungen mittels MS/NMR verzichtet.

### 4.3 Einfluss der Reinstoffe auf die Aktivität der $\alpha$ -Amylase

In der vorliegenden Arbeit wurden 41 polyphenolische Reinstoffe auf die Beeinflussung der Aktivität der pankreatischen  $\alpha$ -Amylase vom Schwein untersucht. Von diesen untersuchten Substanzen wiesen 15 so schlechte Lösungseigenschaften auf, dass eine Bestimmung der  $IC_{50}$  nicht möglich war. Von diesen Substanzen wurden Lösungen untersucht, die, ohne das Enzym in seiner Aktivität zu beeinflussen, eine maximale Löslichkeit der Testsubstanz aufwiesen. Auf eine Bestimmung der  $IC_{50}$  wurde weiterhin dann verzichtet, wenn der Wert in Konzentrationen  $> 5$  mM lag. Aus Kostengründen wurde auch auf die Bestimmung der  $IC_{50}$  bei Cynarin verzichtet. Da der hemmende Effekt im Vergleich zu dem Gemisch der strukturisomeren Isochlorogensäuren deutlich geringer war, wurde Cynarin als nicht aktiv eingestuft. Allgemein konnte ein hemmender Einfluss der Substanzen in Abhängigkeit der Zahl freier OH-Gruppen festgestellt werden. Allerdings scheint nicht nur die Anzahl der freien Hydroxylgruppen für den hemmenden Effekt wichtig zu sein, sondern auch deren sterische Lage. Rohn et al. untersuchten 2002 verschiedene phenolische Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität verschiedener Enzyme, u.a. die Beeinflussung von  $\alpha$ -Amylase. Sie stellten dabei fest, dass Substanzen, die in der Lage sind, Chinone zu formen, einen stärker hemmenden Effekt auf das Enzym ausüben, als solche Komponenten, die das nicht können. In der vorliegenden Arbeit konnte diese These unterstützt werden: Substanzen, die in der Lage sind, Chinone oder Laktone zu bilden bzw. Substanzen mit 4-Oxo-Pyran-Struktur weisen einen besonders ausgeprägten Hemmeffekt auf. So gibt der Unterschied in der Aktivität von Kaffeesäure und Ferulasäure bereits erste Hinweise auf die Abhängigkeit der Wirkung von der Zahl freier OH-Gruppen. Allerdings ist auch die Lage dieser Gruppen am Ringsystem von Bedeutung. So erwiesen sich zwar sowohl Ferula- als auch Isoferulasäure mit  $IC_{50}$ -Werten  $>5$  bzw. 7 mM beide als wenig aktiv, jedoch war das hemmende Potential bei Ferulasäure doch etwas stärker ausgeprägt. Mit zunehmender Methylierung der Hydroxylfunktion sinkt die inhibitorische Potenz weiter. So ist 3(3,4-Dimethoxyphenyl)-propansäure mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $> 12,0$  mM inaktiv gegenüber dem Enzym. Neben der Methylierung scheint hier auch die fehlende Doppelbindung in der Seitenkette aktivitätsmindernd zu sein. So zeigte auch Dihydrokaffeesäure mit einem  $IC_{50}$ -Wert  $> 14,0$  mM keine Aktivität.

Die getesteten Phenylchromanderivate zeigten strukturabhängig eine sehr starke Enzymhemmung mit  $IC_{50}$ -Werten, die teilweise unter 0,2 mM lagen. Ordnet man die

Aktivität der Substanzen in Abhängigkeit ihrer Grundstrukturen, lässt sich folgende aktive Reihe aufstellen: Flavone > Flavonole > Flavanone. Der Oxidationszustand der C-Atome 2, 3 und 4 des Chromanrings (Ring B) des Flavangrundkörpers scheint also für die Wechselwirkung mit dem Enzym mitentscheidend zu sein. Ein gravierender Aktivitätsunterschied zwischen den Glykosiden und den Aglyka konnte nicht festgestellt werden, was die Vermutung zulässt, dass die Zuckerkomponenten nicht erstrangig für die Wechselwirkung mit dem Enzym verantwortlich sind. Festzuhalten ist, dass keine Substanz zu einer vollständigen Enzymhemmung führte, wie sie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Kim et al., 2000).

Der hemmende Effekt von Anthocyanen auf das Enzym ist ebenfalls auffallend. McDougall und Stewart zeigten 2005, dass Anthocyane aus roten Beeren die  $\alpha$ -Glukosidase Aktivität hemmen und so den Blutzuckerspiegel nach stärkereicher Kost reduzieren können.

Neben der Hemmung der  $\alpha$ -Amylase Aktivität durch (-)-Epicatechin mit einer  $IC_{50}$  von  $3,5 \pm 0,04$  mM, konnte für die Substanz auch ein Insulin-artiger Effekt auf die Acetylcholinesterase der Erythrozytenmembran bei Typ 2 Diabetes mellitus gefunden werden (Rizvi & Zaid, 2001).

Voraussetzung der Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf mögliche *in vivo* Resultate ist die Stabilität der Substanzen bis zum Erreichen des Dünndarms bzw. das Entstehen ebenfalls aktiver Metaboliten. So konnte gezeigt werden, dass sich Chlorogensäure in Magen- und Darmsaft als stabil erweist (Takenaka et al., 2000; Olthoff et al., 2001). Ebenso erwies sich Chlorogensäure auch gegenüber enzymatischer Spaltung als stabil. So führte die Inkubation mit einem Extrakt aus humanem Dünndarmepithel, Leber und Plasma nicht zur enzymatischen Spaltung (Plump et al., 1999). Ob die DicaFFEoylchinasäuren eine ähnliche Stabilität aufweisen, ist fraglich. Cynarin jedenfalls erwies sich schon bei den analytischen Untersuchungen als wenig stabil in Lösung, so dass nach kurzer Zeit auch Chlorogensäure in den Untersuchungslösungen nachweisbar war. Deutlich stabiler war hier das Gemisch der Isochlorogensäuren. Daten, die belegen, dass diese Diester nach oraler Gabe auch noch in den oberen Darmabschnitten als solche vorliegen, sind nicht verfügbar. Bei den analytischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Chlorogensäure in 24h alten Untersuchungslösungen nachweisbar war. Eine Esterspaltung hat also stattgefunden. Denkbar ist ein ähnliches Verhalten im Magensaft.

Plasmauntersuchungen, die Luteolin-7-O-glukosid in Form von Phase-II-Konjugaten

nachweisen, belegen die Resorption von Flavonoiden wie Luteolin-7-glukosid nach oraler Applikation von Artischockenblättereextrakt (Wittemer et al., 2005). Diskutiert wurden die enzymatische Spaltung von Flavonolglykosiden an der luminalen Darmwand und die passive Diffusion des Aglykons (Day et al., 2000) aber auch ein aktiver Transport der Glukoside in den Enterozyten (Wolffram et al., 2002). In jedem Fall aber gelangen die Glukoside in die oberen Darmabschnitte, wo sie auch mit der Amylase in Wechselwirkung treten können. Des Weiteren gibt es Untersuchungen, dass Quercetin und Luteolin durch *Eubacterium ramulus*, ein Darmbakterium, abgebaut werden. Dabei entstehen 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure aus Quercetin und 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propansäure aus Luteolin (Braune et al., 2001). Der Abbau weiterer Flavonoide durch dieses Bakterium konnte bereits 2000 durch Schneider & Blaut gezeigt werden. Ein weiteres anaerobes, Flavonoid-abbauendes Bakterium, *Clostridium orbiscindens*, konnte aus humanem Fäces isoliert werden (Schoefer et al., 2003).

Da die pankreatische  $\alpha$ -Amylase im Dünndarm wirkt, ist eine systemische Verfügbarkeit potentieller Inhibitoren, also die Resorption der Komponenten, für eine hemmende Wirkung nicht nötig.

Neben den polyphenolischen Substanzen wurden verschiedene Zucker auf ihre Beeinflussung der Enzymaktivität untersucht. Dabei zeigten hochkonzentrierte Lösungen (100 mg/ml) von Fucose, Rhamnose, Galaktose, Glukose, Fructose und Lactose keine messbare Beeinflussung der  $\alpha$ -Amylase-Aktivität. Dagegen bewirkten Lösungen von Saccharose und Maltose eine deutliche Beeinflussung des Enzyms. Während die Hemmung des Substratabbaus durch 100  $\mu$ l der Saccharoselösung bei  $17,6 \pm 1,3\%$  liegt, wird die Abspaltung des messbaren p-Nitrophenols durch 100  $\mu$ l der Maltoselösung zu  $80 \pm 2,3\%$  gehemmt. Es scheint so, als würden diese Disaccharide mit dem Substrat um den Abbau konkurrieren. Dieser Effekt wird allerdings erst durch hohe Konzentrationen bewirkt. Bemerkenswert ist die Steigerung des gehemmten Substratabbaus durch Kombination von Isochlorogensäure und Maltose. Möglicherweise ist die Disaccharidbindungsstelle durch Isochlorogensäure (bzw. mögliche Spaltprodukte) besetzt. Infolgedessen konkurriert mehr freie Maltose mit dem Substrat um die Substratbindungsstelle, also um das aktive Zentrum. Durch Verdrängung des Substrates aus dem aktiven Zentrum wird dieses weniger stark abgebaut. Entsprechend geringer ist die Konzentration des freiwerdenden p-Nitrophenols. Eine nicht-kompetitive Hemmung des Enzyms durch Maltose, die als Spaltprodukt bei der Hydrolyse von Maltopentaose entsteht, wurde bereits früher diskutiert, während die entstehende Maltotriose kompetitiv hemmt (Al

Kazaz et al., 1998). Es konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass sich die aus dem eingesetzten Substrat 2-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltosid freigesetzte Maltose dagegen kompetitiv in Hinblick auf das Substrat verhält.

Als Positivkontrolle in den Screening-Experimenten wurde Acarbose eingesetzt, deren  $IC_{50}$  mit 0,023 mM bestimmt worden ist. Eine 100%ige Hemmung des Enzyms durch Acarbose konnte im verwendeten Testmodell nicht erzielt werden. Die maximalen Hemmungen durch Acarbose lagen bei 75%. Dagegen lagen Hemmungen durch Reinstoffe teilweise bei über 80% oder gar 90%. Besonders aktiv waren hier Lösungen von Luteolin und Aesculin.

#### 4.4 Enzym-Match Untersuchungen

$\alpha$ -Amylase ( $\alpha$ -1,4-Glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) katalysiert die Spaltung von Stärke (Amylose und Amylopektin), Glycogen und diversen Oligo- und Polysacchariden. Beim Säugetier tritt das Enzym als Speichel- und als Pankreasamylase auf. Die dreidimensionalen molekularen Modelle der humanen Pankreasamylase und der des Schweins sind ausgesprochen ähnlich, ebenso ihr Verhalten gegenüber Inhibitoren (Payan & Qian, 2003). Die pankreatische  $\alpha$ -Amylase ist aus 496 Aminosäuren, einem für die strukturelle Integrität essentiellen Calciumion, einem zur Aktivierung benötigten Chloridion und 425 Wassermolekülen aufgebaut. Seine maximale enzymatische Aktivität zeigt das Enzym bei einem pH-Wert von  $\sim 7$ . Der Bau der pankreatischen  $\alpha$ -Amylase weist drei Bereiche auf. Der größte Bereich ist Domäne A (Aminosäuren 1 – 99 und 169 – 404), die ein zentrales  $(\beta, \alpha)_8$ -Fass bildet. Das Innere des Fasses wird von acht parallelen  $\beta$ -Strängen gebildet, wobei Wasserstoffbrücken die Stränge 1 und 8 verbinden. Dieses  $\beta$ -Fass ist umgeben von einem konzentrischen Zylinder aus  $\alpha$ -Helices.

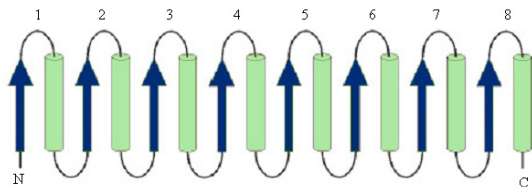


Abb. 55: Aufbau der Sekundärstruktur eines  $(\beta, \alpha)_8$ -Fasses;  $\alpha$ -Helices als hellblaue Zylinder,  $\beta$ -Stränge als dunkelblaue Pfeile dargestellt (nach Przytylski, 2000)

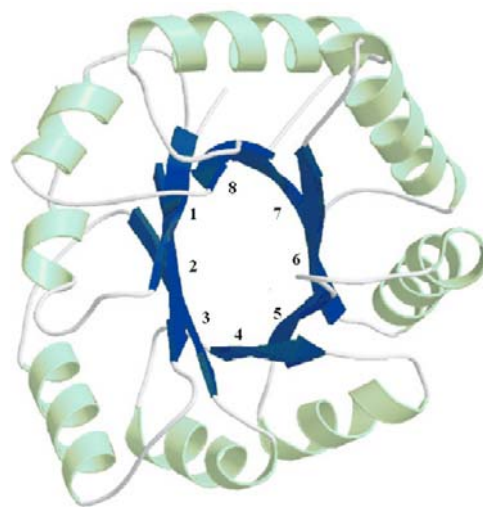


Abb. 56: Anordnung der acht  $\alpha$ -Helices (hellblau) und acht  $\beta$ -Stränge (dunkelblau) zum  $(\beta, \alpha)_8$ -Fass

Domäne B als kleinste Domäne wird durch die Aminosäuren 100 – 168 gebildet. Durch die Faltung der Domäne B entsteht eine Art Tasche zwischen dem dritten  $\beta$ -Faltblatt und der dritten  $\alpha$ -Helix von Domäne A. Hier liegt die Calciumbindungsstelle. Domäne C

(Aminosäuren 405 – 496) erscheint als kugelförmige Einheit. Sie nimmt eine antiparallele  $\beta$ -Fass-Struktur ein und ist relativ lose durch eine Polypeptidkette mit Domäne A verbunden, wodurch hier eine gewisse Strukturflexibilität gegeben ist. Beim Vergleich der primären Sequenzen von  $\alpha$ -Amylasen verschiedener Herkunft weist Domäne C die höchste Variabilität auf.

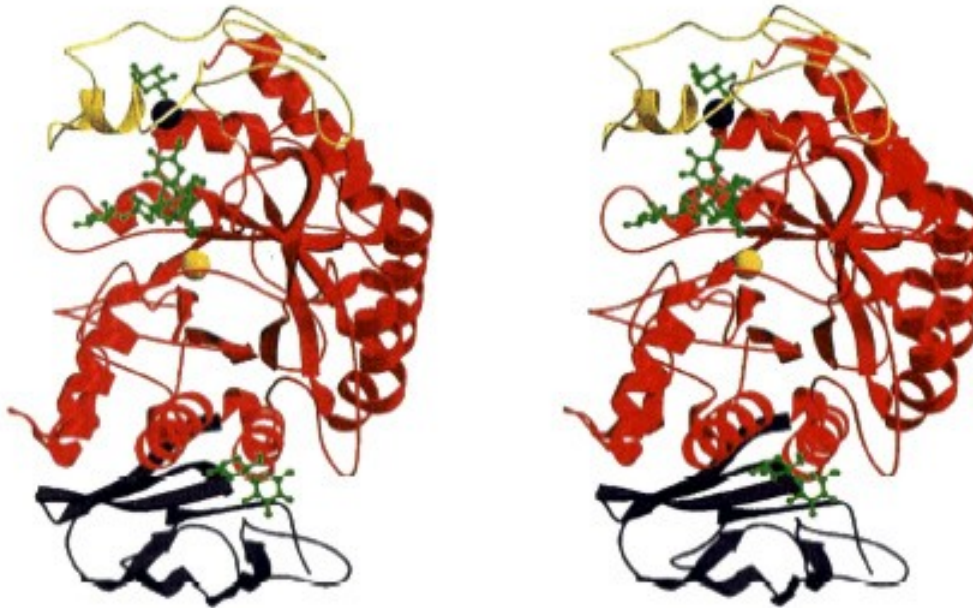


Abb. 57: Pankreas- $\alpha$ -Amylase vom Schwein (Stereobild); Domäne A ist rot dargestellt, Domäne B gelb, Domäne C violett. Calciumion (blaue Kugel) und Chloridion (gelbe Kugel) liegen in unmittelbarer Nähe zum katalytischen Zentrum. Grün sind Acarbose, Mono- und Disaccharidliganden an ihren Bindungsstellen dargestellt. (Qian et al., 1997)

Bauelemente von A und B sind beteiligt an der Bildung der drei wichtigsten Bereiche: dem aktiven Zentrum, der Calciumbindungsstelle und der Chloridbindungsstelle (Brayer et al., 1995; Payan & Qian, 2003; Buisson et al., 1987; Brayer et al., 2000; Koukikolo et al., 2001). Das aktive Zentrum ist in Domäne A lokalisiert und wird durch die Aminosäuren Asp197, Glu233 und Asp300 dargestellt. Enzymologische Untersuchungen haben gezeigt, dass das aktive Zentrum aus einer Reihe von 5 aufeinander folgenden Bindungsstellen (-3, -2, -1, 1, 2) besteht, von denen jede einzelne mit einem Glukosyl-Rest interagiert. Die durch das Enzym katalysierte glykosidische Hydrolyse erfolgt nach einem so genannten Doppel-Displacement-Mechanismus. Dieser 2-Stufen-Mechanismus erfordert das Vorhandensein zweier Aminosäuren mit freier Carboxylgruppe, wobei die eine als Säure-Base-Katalysator, die andere als nukleophiles Agens für die Bildung des Glykosyl-Enzym-Zwischenprodukts



fungiert. Bei der pankreatischen  $\alpha$ -Amylase scheint Glu233 die generelle Aminosäure zu sein, die den glykosidischen Sauerstoff in der zu spaltenden Bindung im ersten Schritt protoniert und im zweiten Schritt die angegriffene OH-Gruppe deprotoniert. Asp197 ist das den Zucker angreifende Nucleophil, das über eine kovalente Bindung das Glycosyl-Enzym-Zwischenprodukt bildet. Die genaue Aufgabe von Asp300 ist noch unklar. Man geht davon aus, dass sie eine wichtige Rolle bei der Katalyse übernimmt (Payan & Qian, 2003; Al Kazaz et al., 1998; Withers, 1995; Qian et al., 1994; Rydberg et al. 2002).

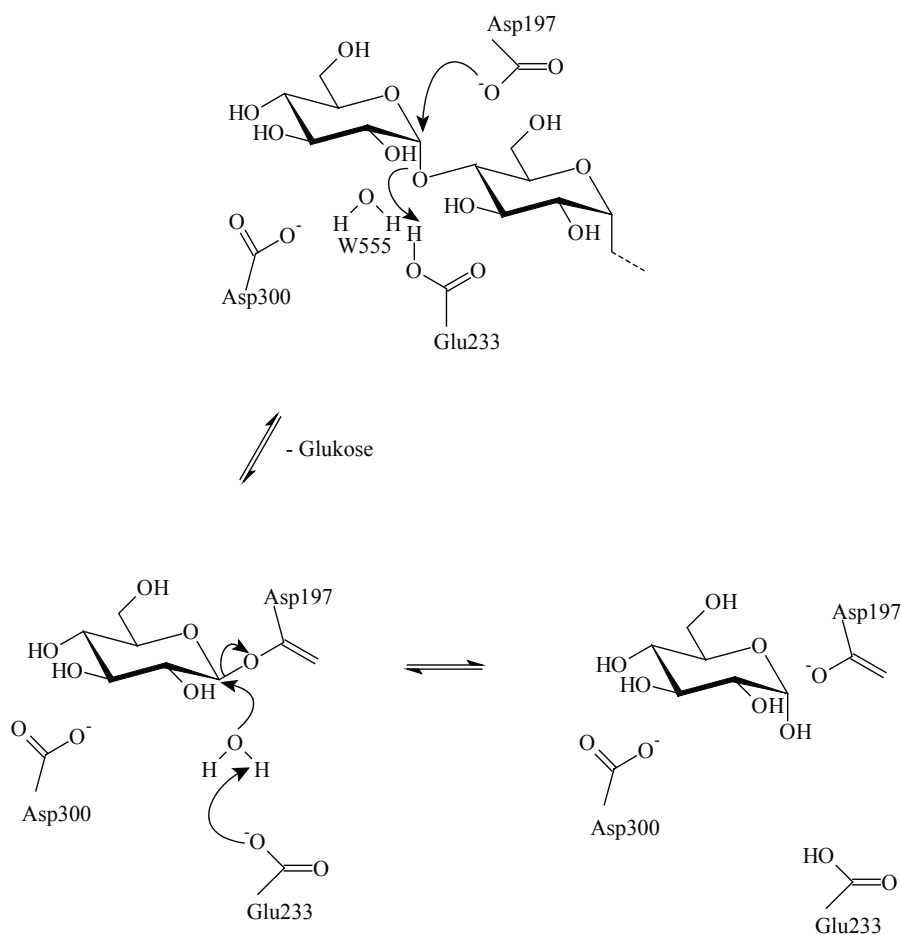


Abb. 58: Reaktionsmechanismus der  $\alpha$ -Amylase bei der hydrolytischen Glykolyse. Im ersten Schritt attackiert das Nucleophil Asp197 den anomeren Kohlenstoff. Gleichzeitig kommt es zur Protonierung des glykosidischen Sauerstoffs durch Glu233, dem Säure/Base-Katalysator. Das entstandene kovalente  $\beta$ -Glykosyl-Enzym-Zwischenprodukt wird hydrolysiert durch ein Wassermolekül (W555), welches wiederum durch die Deprotonierung durch Glu233 aktiviert wurde. Es entsteht das freie Monosaccharid. Die Rolle von Asp300 ist noch nicht vollständig geklärt, aber wegen seiner Position wird angenommen, dass es für die Regulierung des  $pK_a$ -Wertes des Säure/Base-Katalyse-Kreislaufs essentiell ist. (Qian et al., 2001)

Beim Betrachten der Strukturen der untersuchten potentiellen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren fällt auf, dass sie eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit Disacchariden besitzen. Es war daher naheliegend zu untersuchen, ob diese Substanzen eine Passgenauigkeit zur Disaccharidbindungsstelle des Enzyms aufweisen.

Die Disaccharidbindungsstelle der pankreatischen  $\alpha$ -Amylase liegt außerhalb des katalytischen Zentrums, an der Grenze von Domäne A zu Domäne C.

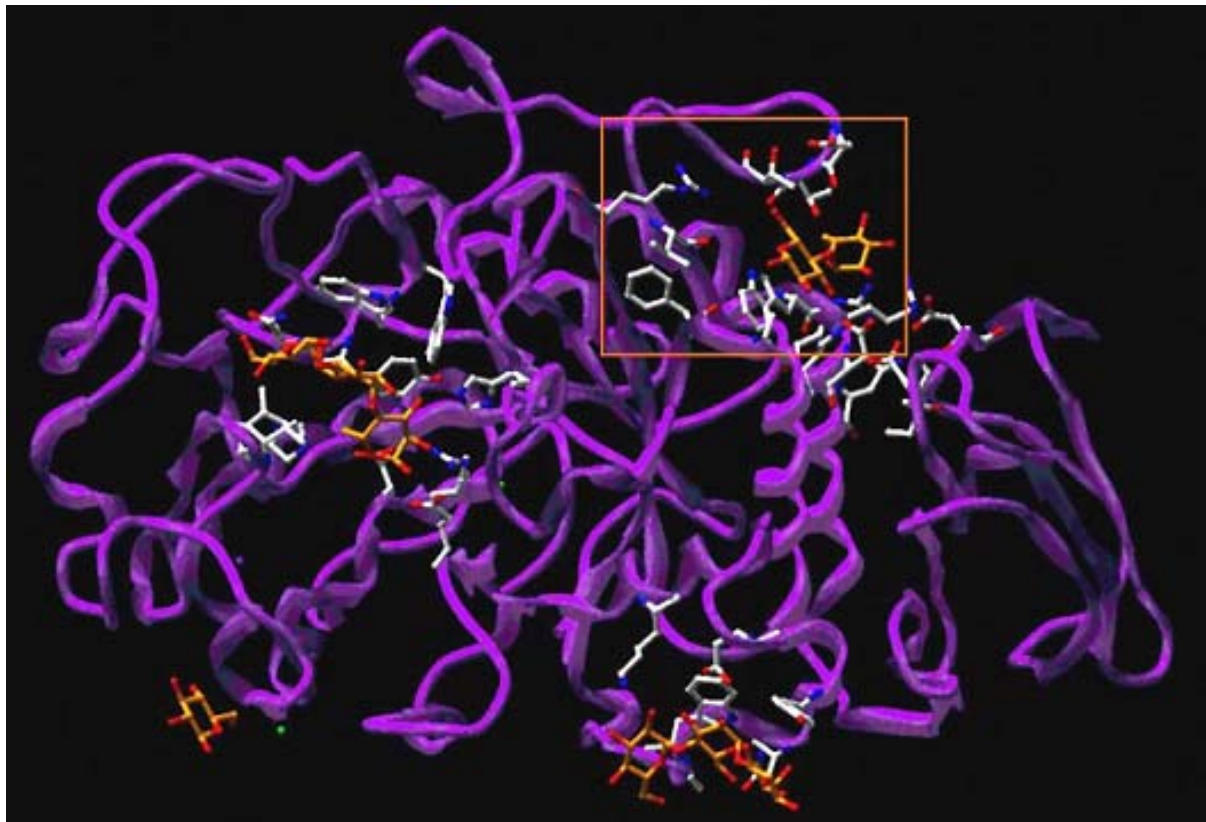


Abb. 59: Pankreas- $\alpha$ -Amylase vom Schwein mit gebundenen Zuckern; die Disaccharidbindungsstelle ist orange markiert und in Abb. 60 vergrößert dargestellt (Abb. von Dr. G. Krause, FMP, Berlin)

Die beiden Zuckerbausteine eines am Enzym fixierten Disaccharids sind ihrem energetischen Minimum entsprechend an ihrer  $\alpha$ -(1,4)-O-glykosidischen Bindung so gegeneinander verdreht, dass sie eine Wasserstoffbrückenbindung über O2-O3' der benachbarten Zuckerreste bilden können. In dieser nahezu spiraligen Struktur windet sich das Disaccharid durch das Enzym.

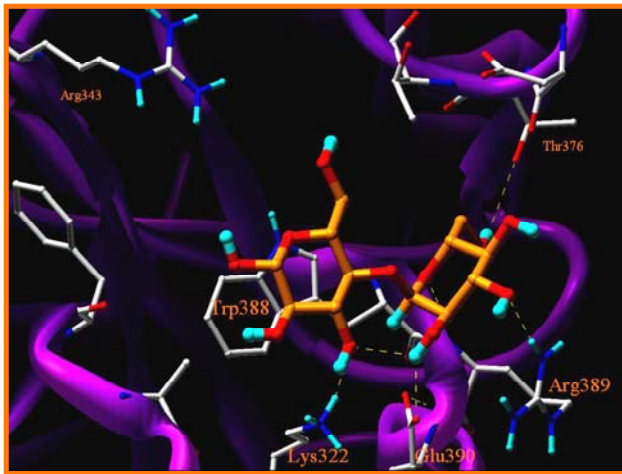


Abb. 60: Disaccharidbindungsstelle im Detail (Abbildung von Dr. G. Krause, FMP, Berlin)

Dabei legt es sich gegen die aromatische Seitenkette von Trp388, der Indolring des Tryptophans ist nahezu parallel zur hydrophoben Zuckerregion gelagert. Der Bau der Disaccharidbindungsstelle wird komplettiert durch eine Triade aus Glu390, Arg389 und Lys322, die wie eine Zange das Disaccharid festhalten (Qian et al., 1995).

Bei der Untersuchung der Beeinflussung der Enzymaktivität durch die Reinstoffe wurden  $IC_{50}$ -Konzentrationen bestimmt, die im millimolaren Bereich liegen. Dies ließ die Vermutung zu, dass der Angriff der Substanzen wahrscheinlich außerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms erfolgt. Die polar-planaren Seitenketten von Arginin, Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie die Aminogruppen von zwei Lysinresten im aktiven Zentrum schaffen ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen um die gebundenen Zuckerreste. Zusätzlich gebundene Wassermoleküle vermitteln zwischen Zucker und Protein (Qian et al., 1995).

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit der Testsubstanzen zu Disacchariden wurde ein möglicher Angriff der Substanzen an der Disaccharidbindungsstelle untersucht. Wie bereits beschrieben, sind die wichtigen Aminosäuren innerhalb dieser Bindungsstelle Trp388, welches für die hydrophobe Wechselwirkung mit dem Zucker verantwortlich ist, sowie Glu390, Arg389 und Lys322, die den Zucker zangenartig festhalten.

Als Modell-Substanzen wurden Chlorogensäure und sein Strukturisomer Isochlorogensäure ausgewählt. Beide Substanzen unterscheiden sich lediglich durch Konfiguration der OH-Gruppe an Position 4 des Cyclohexanrestes. Beide Substanzen verfügen über Hydroxylfunktionen, die in Wechselwirkung mit den Aminosäuren Glu390, Arg389 und Lys322 der Disaccharidbindungsstelle treten können. Dies zeigen die Abbildungen 43 bis 46

sehr deutlich. Ebenso ist die sterisch günstigere Lage der Isochlorogensäure erkennbar. Abbildung 46 zeigt nochmals klar die strukturelle Ähnlichkeit der Testsubstanzen mit Maltose. Legt man Maltose und Isochlorogensäure innerhalb der Disaccharidbindungsstelle übereinander, weisen die Strukturen deutliche Übereinstimmungen der Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym auf. Die Zahl der freien OH-Gruppen, die direkt am Cyclohexanring des (Iso)Chlorogensäure-Moleküls gebunden sind, stimmt mit der Zahl der direkt am D-Glukose-Fragment gebundenen Hydroxylgruppen überein. Ebenso ist die parallele Ausrichtung zum Indolring des Trp388 denkbar, die hydrophobe Wechselwirkungen zu Trp388, beispielsweise über van-der Waals-Kräfte, erlaubt. Belegen lässt sich diese Vermutung durch die durchgeführten Kombinationsexperimente mit Maltose und Isochlorogensäure. Dabei zeigte sich, dass Maltose in Kombination mit Isochlorogensäure zu einem deutlich verringerten Substratabbau führte. Während die getestete Maltoselösung in einer Konzentration von 5 mg/ml zu einem um 10% verringerten Abbau des Substrates führte, bewirkte die Kombination mit Isochlorogensäure in der  $IC_{50}$ -Konzentration einen um fast 80% gehemmten Substratabbau. Al Kazaz et al. beschrieben 1998 bei der Untersuchung des Abbaus von Maltopentose, dass mit Maltose und Maltotriose zwei Spaltprodukte entstehen, die beide einen hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben. Dabei hemmt die freiwerdende Maltose nicht-kompetitiv, die freiwerdende Maltotriose kompetitiv. Bemerkenswert ist nun die gesteigerte Hemmung des Enzyms unter der Kombination von Isochlorogensäure und Maltose. Scheinbar ist durch Belegung der Disaccharidbindungsstelle die Fixierung der Maltose am Enzym nicht gegeben, so dass der Zucker bemüht ist, eine andere Stelle zur Wechselwirkung zu finden. Dies würde durch Verdrängen des Substrats PNPG5 aus dem aktiven Zentrum gelingen. Infolge dessen wird weniger Substrat abgebaut. Innerhalb der Disaccharidbindungsstelle, die ja zwischen Domäne A und C zu finden ist, scheinen die gebundenen Testsubstanzen zusätzlich auch eine Konformationsänderung der Domäne A des Enzyms zu bewirken, die direkten Einfluss auf das aktive Zentrum innerhalb dieser Domäne und seine Bindungstaschen hat. Scheinbar ist durch die gebundenen Substanzen die Fähigkeit zur Wechselwirkung der einzelnen Bindungsstellen mit den Glykosylresten des zu spaltenden Kohlenhydrates behindert. Als Folge daraus erfolgt die Zuckerspaltung stark reduziert.

## 4.5 *in vivo* Versuche

Der für die *in vivo* Versuche eingesetzte Königsartischockenextrakt zeigte bereits in den *in vitro* Versuchen ein ausgeprägtes Potential, die  $\alpha$ -Amylase Aktivität zu hemmen. Dieses Hemmverhalten konnte durch die durchgeführten *in vivo* Versuche bestätigt werden.

Die standardisierte Kost war erforderlich, weil Menge und Art der zugeführten Kohlenhydrate die glykämische Antwort beeinflussen. Die festgelegte stärkereiche Kost sowie ein vorangegangenes Fasten über Nacht gewährleisteten eine ausgeprägte Amylase-Wirkung mit gut darstellbarer postprandialer Blutzuckerspitze. Somit konnte die Beeinflussung durch die Königsartischockenextrakt-Kapseln und die Positivkontrolle Acarbose, die sich in einer weniger stark ausgeprägten Blutzuckerspitze äußern sollten, gut beobachtet werden. Während die Einnahme der Acarbose bei allen Probanden nach Vorschrift mit dem ersten Bissen der Nahrung erfolgte, erfolgte die Einnahme des verkapselten Königsartischockenextraktes variabel in einem Zeitfenster von 5-10 Minuten vor der Nahrungsaufnahme. Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von 200 mg Königsartischockenextrakt die postprandiale Blutzuckerspitze mit durchschnittlich 36,7% in einer ähnlich signifikanten Größenordnung reduzierte wie die Einnahme von 50 mg Acarbose (Mittelwert 52,3%). Dokumentierte Nebenwirkungen wie Blähungen oder Darmgeräusche wurden von allen Probanden unter der Acarboseeinnahme festgestellt. Diese unerwünschten Effekte unterblieben bei der Einnahme des verkapselten Artischockenextraktes, andere Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

Die Wirksamkeit von Extrakten aus Artischockenblättern ist vielfach dokumentiert. Nachgewiesen wurden bislang choleretische, lipidsenkende, hepatoprotektive Effekte sowie eine deutliche Wirkung bei Dyspepsie. Bei dyspeptischen Beschwerden beruht die Wirkung im Wesentlichen auf einer gesteigerten Cholerese (Wegener & Schmidt, 1995). Da die gesteigerte Cholerese als Anregung der Leberfunktion anzusehen ist, lässt sich daraus ableiten, dass die Leber ein Zielorgan von systemisch verabreichten Artischockenzubereitungen ist. So konnte die Wirksamkeit von Artischockenblättereextrakt bei Dyspepsie in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie nachgewiesen werden (Holtmann et al., 2003). Gut belegt ist auch die Leberschutzwirkung der Artischocke. So zeigten polyphenolische Substanzen der Artischocke eine hepatoprotektive Aktivität an isolierten Rattenhepatozyten. Diese Aktivität wurde auf die antioxidativen Eigenschaften der Komponenten zurückgeführt, die Lipoperoxidation der Phospholipide der Hepatozytenmembran verhindern sollen (Adzet et al., 1987). Auch als Zusatztherapeutikum

in der Malariatherapie wird die Leberschutzwirkung der Artischocke ausgenutzt. Man folgert hier, dass die Artischockenextrakte die Leberpathogenität der Malariaanfalle reduzieren (Brand, 1999).

Die günstige Beeinflussung der Blutlipidwerte durch Artischockenzubereitungen ist bereits länger bekannt. Eine durchschnittliche Senkung des Gesamtcholesterins um 10-20% wurde in verschiedenen Studien festgestellt. Zusätzlich existieren Berichte über signifikante und dauerhafte Gesamtcholesterol- und Triglycerid-Senkungen um 10-12% nach sechs Wochen bzw. sechs Monaten Einnahme eines wässrigen Artischockenblätter-Trockenextrakts. Dabei konnte weiterhin ein günstiger Differentialeffekt mit der Senkung der LDL-Werte bei entgegengesetztem Trend der HDL-Werte festgestellt werden (Brand, 1999). Gebhardt konnte zeigen, dass Artischockenextrakte in der Lage sind, die hepatische Cholesterolsynthese ausgeprägt zu hemmen. Diskutiert wurden dafür HMG-CoA-Reduktase inaktivierende Mechanismen (Gebhardt, 1998).

Demnach konnten über Studien, die die Senkung von Gesamtcholesterol und Triglyceriden belegen, gezeigt werden, dass durch Einnahme von Artischockenblätterextrakten zwei Risikofaktoren innerhalb des Formenkreises Metabolisches Syndrom positiv beeinflusst werden. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine Absenkung der postprandialen Blutzuckerspitze durch Artischockenblätterextrakt erzielt werden kann. Neuere Studien wie die Funagata Diabetes Study und die Diabetes Intervention Study zeigen, dass vor allem postprandiale Hyperglykämien und nicht erhöhte Nüchternblutzuckerwerte ein wichtiger Faktor für die Entwicklung mikro- und makrovaskulärer Komplikationen sein können (Tominaga et al., 1999; Hanefeld & Temelkova-Kurktschiev, 1998).

Auch bei Nicht-Diabetikern ist ein hoher postprandialer Blutzuckerspiegel ein Risikofaktor für atherosklerotische Ereignisse und damit für kardiovaskuläre Ereignisse (Hanefeld et al., 1999).

Zusätzlich hat sich der Einsatz von  $\alpha$ -Glukosidase-Hemmstoffen in der Prävention von Typ II Diabetes mellitus bei Hoch-Risiko-Patienten bewährt. So konnte mit der STOP-NIDDM-Studie belegt werden, dass Acarbose die Entstehung eines manifesten Diabetes aus einer eingeschränkten Glukosetoleranz verhindern kann (Chiasson et al., 1998 & 2002).

Könnten die erzielten *in vitro* und *in vivo* Resultate des Artischocken-Spezial-Extraktes durch weiterführende Studien bestätigt werden, ließe sich hier ein wirksames Agens zur Behandlung

des Metabolischen Syndroms finden. Zuzüglich zu den bekannten positiven Effekten auf Cholesterol- und Lipidstoffwechsel konnte nun auch mit der vorliegenden Arbeit eine über eine  $\alpha$ -Amylase-Hemmung erklärbare Reduktion postprandialer Blutzuckerspitzen gezeigt werden.