



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Integrative Research Center Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit

Extraktion und Screening bioaktiver Naturstoffe als erster Schritt der Entwicklung neuroregenerativer Therapien

Stefanie Ritter

Vollständiger Abdruck der von der promotionsführenden Einrichtung Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. habil. Cordt Zollfrank

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Herbert Riepl
2. Prof. Dr. Volker Sieber

Die Dissertation wurde am 12.02.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der promotionsführenden Einrichtung Campus Straubing für Biotechnologie und Nachhaltigkeit am 30.08.2021 angenommen.

Gewidmet meiner Oma Lina & meiner Patentante Getraud.

*„Die Schutzengel unseres Lebens fliegen manchmal so hoch,
dass wir sie nicht sehen können,
doch verlieren sie uns nie aus den Augen.“*

Jean Paul

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von März 2017 bis August 2020 an der Professur Organisch-Analytische Chemie der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf am TUM Campus Straubing.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Herbert Riepl für das bereitgestellte interessante Thema, das Vertrauen in meine eigenständige Arbeit, die wertvollen Diskussionen und die gute Betreuung.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Frau Dr. Corinna Urmann für die gute Betreuung, die Hilfe bei der MS-Analytik und die Tipps im Labor und in der Zellbiologie.

Großer Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Volker Sieber für die Begutachtung dieser Arbeit und an Herrn Prof. Dr. Cordt Zollfrank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Sébastien Couillard-Després und Dr. Lara Bieler für die durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg bedanken und die Möglichkeit, die zellbiologischen Untersuchungsmethoden zu erlernen.

Großer Dank geht an Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich und Thomas Geisberger für die NMR Messungen, NMR Vorhersagen und die hilfreichen Diskussionen in Bezug auf die Auswertung.

Der Firma PhytoLab GmbH & Co. KG, insbesondere Dr. Jan Glaser, danke ich für die Unterstützung bei der Strukturaufklärung und die gute Zusammenarbeit im Hinblick auf die Publikation.

Meinen Laborkollegen Dr. Veronika Huber, Tobias Burger, Dr. Michael Kirchinger, Rainer Herzog, Sebastian Bieringer und Theresa Able danke ich für die gute Zusammenarbeit und die schönen Jahre zusammen im und außerhalb des Labors.

Außerdem möchte ich mich bei den Sekretärinnen Dorothea Rönsch, Ingrid Meindl und Roswitha Karl für die Unterstützung bei administrativen Aufgaben und Erledigungen bedanken.

Dem Lehrstuhl Chemie Biogener Rohstoffe danke ich für die Möglichkeit, unsere Zellkultursensilien autoklavieren zu können.

Meinen Eltern Marianne und Anton, meinem Bruder Johannes, meiner Cousine Andrea und ihrer Familie gilt großer Dank für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt. Zuallerletzt danke ich Tobias für seine Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung: Konzept der neuronalen Plastizität als pharmakologischer Therapieansatz und die Bedeutung des Naturstoffscreenings.....	4
2 Stand des Wissens zu geriatrisch aktiven Heilpflanzen und neuroaktiven Naturstoffen...	10
2.1 <i>Bacopa monnieri</i>	10
2.1.1 Inhaltsstoffe von <i>Bacopa monnieri</i>	11
2.1.2 (Neuro)-pharmakologische Eigenschaften von <i>Bacopa monnieri</i>	14
2.2 Indolalkaloide.....	31
2.2.1 Indirubine und Thioindirubine.....	32
2.2.2 Pharmakologische Eigenschaften von Indirubinen und Thioindirubinen.....	34
2.2.3 3,4-annelierte, peptidartige Indolderivate	36
2.2.4 Pharmakologische Eigenschaften von Indolderivaten	37
3 Problemstellung und Zielsetzung	39
4 Extrakterstellung und Strukturaufklärung.....	40
4.1 Extraktion von <i>Bacopa monnieri</i>	40
4.2 Eigene Ergebnisse der Extraktion.....	41
4.3 Diskussion der Extraktion	48
4.4 Strukturaufklärung	49
4.5 Eigene Ergebnisse der Strukturaufklärung.....	52
4.6 Diskussion der Strukturaufklärung	63
5 Untersuchung der Neurogenese	65
5.1 Ergebnisse und Diskussion.....	67
5.1.1 Differenzierungsinduzierende Aktivität des Rohextraktes und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Extrakte aus <i>Bacopa monnieri</i>	67
5.1.2 Differenzierungsinduzierende Aktivität der durch Festphasen-Extraktion erhaltenen Extrakte aus <i>Bacopa monnieri</i>	69
5.1.3 Differenzierungsinduzierende Aktivität der Reinsubstanzen in <i>Bacopa monnieri</i>	74
5.1.4 Differenzierungsinduzierende Aktivität von Indolalkaloiden.....	81
5.2 Diskussion der Differenzierungsinduzierenden Aktivitäten	91
6 Diskussion und Ausblick	93
7 Experimenteller Teil	96
7.1 Chemikalien.....	96
7.2 Extraktion und Analyse	96
7.2.1 Trockenmassebestimmung.....	96
7.2.2 Pflanzenmaterial.....	96
7.2.3 Vorversuche	97

7.2.4	Extraktherstellung	97
7.2.5	Extraktaufreinigung	98
7.2.5.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)	98
7.2.5.2	Fraktionierende Festphasen-Extraktion (SPE)	98
7.2.5.3	Puriflash	98
7.2.6	HPLC-ELSD	99
7.2.7	HPLC-IT TOF	99
7.2.8	Kalibrierung	100
7.2.9	Gefriertrocknung	100
7.2.10	NMR-Spektroskopie	100
7.2.11	GC-MS	101
7.2.12	Absorbanzmessungen	101
7.2.13	Schmelzpunktmessung	101
7.3	Zellkulturarbeiten	101
7.4	Synthesen der Thioindirubine	102
8	Literaturverzeichnis	108
9	Anhang	121
9.1	Abbildungen und Tabellen	121
9.2	Abkürzungsverzeichnis	127
9.3	Abbildungsverzeichnis	130
9.4	Tabellenverzeichnis	135
	Veröffentlichungen und Stipendien	136

Zusammenfassung

Bei der Entwicklung neuer Arzneimittel zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson, Demenz, Alzheimer und Schlaganfällen ist die Neurogenese als innovativer Therapieansatz in den letzten zehn Jahren in den Fokus gerückt. Die auf diese Weise neu gebildeten Neuronen könnten den durch die Krankheit erlittenen Funktionsverlust möglicherweise beheben. Ausgangspunkt für die Entwicklungen ist das Auffinden neuer Leitstrukturen, welche potenziell die Neurogenese auslösen. Der Fokus dieser Arbeit lag zum einen auf Pflanzeninhaltsstoffen der ayurvedischen Heilpflanze *Bacopa monnieri*, zum anderen auf synthetisch hergestellten oder aus Bakterien gewonnenen Indolalkaloiden und synthetisch hergestellten Thioindirubinen.

Im ersten Teil der Arbeit wird die Extraktionsoptimierung der Pflanze *B. monnieri* und die Fraktionierung der erhaltenen Extrakte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion beschrieben. Ziel der Extraktionsoptimierung war es, Bacoside und Flavonoide möglichst angereichert zu erhalten. Dabei wurden die Anreicherungsfaktoren für Bacosid A und Luteolin vom Rohextrakt bis zum erhaltenen Festphasenextrakt bestimmt. Die Gehalte der beiden Substanzen Bacosid A und Luteolin wurden mittels HPLC-ELSD bestimmt. Die Ergebnisse der Arbeit liefern einen wichtigen Beitrag zur Behandlung des *B. monnieri* Extraktes mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion, wodurch eine fünffache Anreicherung von Bacosid A und eine zehnfache Anreicherung von Luteolin möglich ist.

Bei der genauen Untersuchung einer weiteren Fraktion wurde mit den käuflich erworbenen Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure gearbeitet, um einzelne in verschiedenen Fraktionen enthaltene Substanzen anhand der Retentionszeiten zuordnen zu können. Die Überprüfung der Referenzsubstanzen zeigte, dass es sich bei dem für *B. monnieri* bekannten Triterpen Bacosin um Betulinsäure handelt. Des Weiteren konnte in untersuchten *B. monnieri* haltigen Nahrungsergänzungsmitteln und Extrakten mittels HPLC-IT TOF kein Bacosin sondern ausschließlich Betulinsäure detektiert werden.

Die anschließende Untersuchung im Hinblick auf die Neurogenese ergab, dass die in *B. monnieri* enthaltenen, vielversprechenden Bacoside keine differenzierungsinduzierende Wirkung zeigen. Jedoch zeigte das in Spuren enthaltene Apigenin eine deutliche und die Stoffe Luteolin und Luteolin-7-glucosid eine leicht differenzierungsinduzierende Aktivität.

Bei der Untersuchung diverser Indolalkaloide konnten große Unterschiede zwischen den zwei unterschiedlichen Strukturtypen aufgezeigt werden. Die untersuchten 3,4-annelierten, peptidartigen Indolalkaloide zeigten keine signifikanten Effekte in Bezug auf die Neurogenese. Die synthetisierten Thioindirubine hingegen zeigten alle eine leichte Aktivität bei einer Konzentration von 10 μM und das untersuchte 5'-Methylthioindirubin zeigte in dieser Konzentration stark differenzierungsinduzierende Effekte, welche vergleichbar mit der Positivkontrolle Retinsäure und Valproinsäure sind. Selbst bei einer Konzentration von 1 μM war 5'-Methylthioindirubin

aktiver im Vergleich zu den übrigen untersuchten Thioindirubinen. Die Struktur-Aktivitäts-Untersuchung der unterschiedlichen Thioindirubine ergab, dass die Größe des Substituenten an Position 5' entscheidend ist, wobei eine Substitution der Thioindirubine an Position 5 keine starken Effekte auf die Differenzierung zeigt.

Summary

Developing new medicines for the treatment of neurodegenerative diseases such as Parkinson's, dementia, Alzheimer's and strokes, neurogenesis has become an innovative therapeutic approach. Newly formed neurons may possibly replace the loss of function due to the disease. Discovering interesting lead structures that trigger neurogenesis is important for future medicines.

This thesis focuses on the one hand on ingredients of the Ayurvedic plant *Bacopa monnieri*, on the other hand on synthetically produced or from bacteria derived indole alkaloids and synthetically produced thioindirubins.

The first part of the thesis deals with the extraction optimization of *B. monnieri* and the fractionation of the obtained extracts using liquid-liquid extraction and solid-phase-extraction to enrich bacosides and flavonoids. The enrichment factors for bacoside A and luteolin from the raw extract to the obtained solid-phase-extract were determined using HPLC-ELSD. The described procedures allow a fivefold enrichment of bacoside A and a tenfold enrichment of luteolin.

Comparing the retention times of the compounds in one of the fractions with two commercial reference substances of bacosine and betulinic acid led to the conclusion that the triterpene bacosine, known exclusively for *B. monnieri*, is indeed betulinic acid. Furthermore, the analysis of several dietary supplements and extracts of *B. monnieri* by HPLC-IT TOF did only detect betulinic acid and no bacosine.

The subsequent study regarding neurogenesis showed that the promising bacosides contained in *B. monnieri* do not show a differentiation inducing activity. Apigenin, which is contained in traces, showed a moderate differentiation inducing activity, whereas luteolin and luteolin-7-glucoside exhibited slight differentiation inducing activity.

The study of indole alkaloids revealed notable differences between the two different structural types. The investigated 3,4-annelated peptide-like indole alkaloids showed no significant effects on neurogenesis. In contrast, the investigated thioindirubins show slight activity at a concentration of 10 μM and the investigated 5'-methylthioindirubin showed very good effects at this high concentration, which are comparable to the positive control. Even at a concentration of 1 μM , 5'-methylthioindirubin showed good differentiation inducing activity compared with the other tested thioindirubins. The proposed structure activity relationship of the different thioindirubins suggested that the size of the substituent at position 5' is decisive, whereas a substitution of the thioindirubins at position 5 does not have strong effects on the differentiation inducing activity.

1 Einleitung: Konzept der neuronalen Plastizität als pharmakologischer Therapieansatz und die Bedeutung des Naturstoffscreenings

Seit Jahren steigt die mittlere Lebenserwartung der deutschen Bevölkerung an [1, 2]. Das statistische Bundesamt hat in der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung die durchschnittliche Lebenserwartung für die Jahre 2016 bis 2018 veröffentlicht [3]. Dabei lag das Alter der Frauen im Schnitt bei 83,3 Jahren, das Alter der Männer bei 78,5 Jahren [3]. Die Berechnung des statistischen Bundesamtes legt auch dar, dass die mittlere Lebenserwartung der Bevölkerung über die letzten Jahre stetig gestiegen ist und auch in Zukunft weiter steigen wird [3]. Als Gründe hierfür können vor allem die Fortschritte in der Medizin, beispielsweise die Entwicklung von Impfungen und Antibiotika und die Seuchenbekämpfung, genannt werden [2]. Trotz dieser Fortschritte steigt im Alter das Risiko, altersassoziierte Erkrankungen zu erleiden [4]. Hierzu gehören beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Diabetes, Osteoporose und neurodegenerative Erkrankungen [2, 4]. Die Zusammenhänge des Alterns und der Neurodegeneration werden in der Wissenschaft zunehmend untersucht, wobei davon ausgegangen wird, dass der Prozess durch viele Umstände beeinflusst wird [2, 5]. Die Theorien zu diesem Thema sind unterschiedlich komplex. Es ist jedoch weitreichend untersucht, dass freie Radikale und der daraus resultierende oxidative Stress von enormer Bedeutung bei neurodegenerativen Krankheiten zu sein scheinen [2, 5]. Dabei werden sowohl Proteine und Lipide als auch die DNA und die RNA von reaktiven Sauerstoff- und Stickoxidradikalspezies angegriffen, wenn diese in zu hoher Konzentration im Körper vorliegen [2]. Da das Gehirngewebe und Neuronen oxidativem Stress weniger Stand halten können und die detoxifizierenden Mechanismen immer schwächer werden, kann dies das Absterben der Zellen und somit einen Funktionsverlust zur Folge haben [5, 6]. Bei allen neurodegenerativen Erkrankungen kommt es mit der Zeit dazu, dass Neuronen, welche im Nervensystem informationsverarbeitende Zellen sind, aufgrund von Ablagerungen der oxidativen Stoffwechselprodukte absterben [4].

Die Tatsache, dass Neuronen sich nicht teilen können und somit ein Leben lang funktionieren sollten, ist dahingehend problematisch, da durch das Absterben von Neuronen bei altersbedingten Erkrankungen ein Verlust dieser entsteht [4, 7].

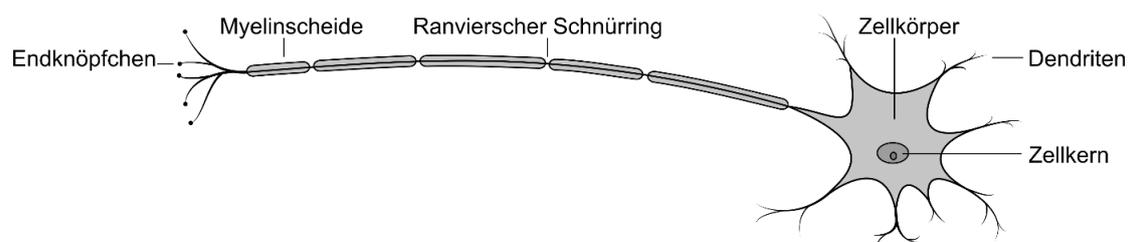


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Neurons mit dem Zellkörper, dem darin enthaltenen Zellkern und den Dendriten, dem Axon mit der Myelinscheide, dem Ranvierschen Schnürring und dem Endknöpfchen nach Hildebrand und Goslow [8].

Abbildung 1 zeigt den Aufbau von Neuronen. Diese Neuronen bestehen aus drei übergeordneten Teilen, wobei es sich um den Zellkörper, die Dendriten und das Axon handelt [9]. Zentrum eines Neurons ist der Zellkörper, auch Soma (griechisch: Körper) genannt, welcher rund, oval, dreieckig oder sternförmig sein kann und einen Durchmesser von 10-50 µm hat [8-10]. Neben dem Zellkern befinden sich im Zellkörper verschiedene Zellorganellen [9]. Diese sind für die Energieversorgung, den Aufbau und Transport von Proteinen und die Speicherung der genetischen Information verantwortlich [9]. Die vom Zellkörper ausgehenden Ausläufer sind unterteilt in die Dendriten und das Axon, wobei beide oftmals auch unter dem Begriff Neurite zusammengefasst werden [10]. Dendrite, welche sich häufig stark verzweigen, sind eine Art Antenne der Nervenzelle und empfangen die Signale anderer Nervenzellen über deren Synapsen [8]. Das Axon einer Nervenzelle, welches bis zu einem Meter lang sein kann, ist von einer Myelinscheide umgeben [9, 10]. Diese Myelinscheide fungiert als elektrische Isolationschicht und besteht aus Oligodendrozyten [9, 10]. Eine Unterbrechung der Myelinscheide findet in gleichmäßigen Abständen durch Ranviersche Schnürringe statt [9]. Das Ende des Axons bildet das Endknöpfchen, wodurch es Synapsen zu anderen Neuronen bilden kann [10].

Als Beispiele für neurodegenerative Krankheiten, bei denen Neuronen absterben, werden unter anderem Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Morbus Huntington sowie der Schlaganfall, welcher durch Gefäßschäden entsteht und dieselben Effekte zeigt, herangezogen [4, 7]. Zusammenfassend führen Zellverluste bei all diesen Erkrankungen zu irreversiblen Schäden.

Bei Morbus Alzheimer, einer der bekanntesten neurodegenerativen Krankheit, kommt es zum Funktionsverlust der Zellen aufgrund der Ablagerung von Proteinaggregaten [4]. Dabei werden zwei verschiedene Arten an Proteinaggregaten beschrieben, zum einen die intrazellulären Alzheimer-Fibrillen (Tau-Proteine) und zum anderen die senilen Plaques (Amyloid-β-Peptide) [4]. Inwieweit ein Zusammenspiel beider Proteinablagerungen bei einem Krankheitsausbruch gegeben ist, ist bisher nicht geklärt [4]. Die Proteinablagerungen führen zu einem fortschreitenden Abbau von Neuronen und damit der kognitiven Fähigkeiten, was zu Veränderungen im Wesen und Verhalten der erkrankten Person führt [4, 11, 12].

Als weitere, relativ häufige neurodegenerative Krankheit wird Morbus Parkinson beschrieben [4]. Bei dieser Krankheit sterben dopaminerge Neuronen in der Substantia nigra ab [4]. Dies geschieht entweder durch Neurotoxine oder aufgrund der Verstoffwechslung von Dopamin, wobei toxische Semichinone, relativ langlebige Radikal-Ionen, in einem Zwischenschritt entstehen können [4]. Da die dopaminergen Neuronen für die Bewegungsplanung und den Bewegungsbeginn entscheidend sind, ist eine sich zunehmend verschlechternde Motorik der Erkrankten die Folge [4, 9, 12].

Auch die etwas weniger bekannte Krankheit Morbus Huntington gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen [4]. Hierbei handelt es sich um eine Erbkrankheit, bei der sich das Protein Huntingtin im Striatum ablagert [4]. Durch die Proteinablagerung und den daraus resultierenden Zelltod kommt es anfangs zu Bewegungsstörungen, wobei die Erkrankten ihren Rumpf

und ihre Extremitäten nicht mehr steuern können [4, 10]. Im Laufe der Krankheit sterben Nervenzellen auch in anderen Gehirnregionen ab, was zu psychischen Problemen, einer Demenz und schließlich zum Tod führt [4, 10].

Der Schlaganfall beschreibt die dritthäufigste Krankheit weltweit, wobei hierbei durch eine Ischämie (Verstopfung) oder eine Blutung im Gehirn neurologische Störungen ausgelöst werden [13]. Abhängig davon, welche Art des Schlaganfalls an einem bestimmten Ort im Gehirn vorkommt, kann es zu neurologischen Störungen kommen [10, 13]. Diese können von Sprachstörungen bis zu motorischen Störungen reichen [10, 13]. Die betroffenen Regionen im Gehirn erholen sich in vielen Fällen nicht mehr vollständig, da in diesen Arealen Neuronen unwiederbringlich abgestorben sind [7, 14].

Mit der Beschreibung der adulten Neurogenese als Prozess der Neubildung von Neuronen wächst die Hoffnung, eine Vielzahl der neurodegenerativen Krankheiten therapieren zu können [15]. Diese Neubildung von funktionsfähigen Neuronen wurde bereits vor über 60 Jahren das erste Mal beschrieben, jedoch dann vorerst nicht weiter verfolgt [5, 16, 17]. So besteht eine gewisse Variabilität im Zellverband des Gehirns, welche als Plastizität bezeichnet wird [16]. Inzwischen ist erwiesen, dass im Gehirn eine so hohe Plastizität vorhanden ist, dass diese Neubildung und eine Integration von Nervenzellen aus Stammzellen in zwei Regionen des Gehirns auch bis ins hohe Alter vorkommt [16, 18]. Hierbei handelt es sich um den Bulbus olfactorius und den Hippocampus [16]. Besondere Bedeutung kommt der Plastizität bei Gedächtnisbildung und dem Erwerb neuer Bewegungsmuster zu [19]. Es ist bekannt, dass die Gedächtnisbildung im Alter unumgänglich schwieriger wird [4]. Die Bildung neuer Nervenzellen aus Stammzellen findet in drei Schritten statt, welche als Proliferation, neuronale Determination und Reifung beschrieben werden [16]. Ab dem Schritt der Bildung von neuronalen Vorläuferzellen wird das Markerprotein Doublecortin (DCX) exprimiert, welches mit Hilfe eines Screening Assays bestimmt werden kann [20]. Hierbei ist eine erhöhte Expressierung dieses Markerproteins ein Zeichen für die Neurogenese [20].

Die Steigerung der Neurogenese gilt im Folgenden als Behandlungskonzept neurodegenerativer Erkrankungen. Wegen der steigenden Lebenserwartung und der damit verbundenen erhöhten Anzahl an neurodegenerativen Erkrankungen ist es von großer Bedeutung, verschiedene Substanzen zu prüfen, welche im Verdacht stehen, die Differenzierung der Stammzellen zu Neuronen auszulösen, um zu Therapien zu gelangen. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt, um solche Moleküle zu finden, welche die Differenzierung auslösen. Zu den bekannten Molekülen, welche die Differenzierung auslösen, gehören unter anderem kleine Moleküle, wie beispielsweise die Retinsäure, aber auch körpereigene Moleküle wie der Nervenwachstumsfaktor (NGF) [21, 22]. Derartige Moleküle können bei der Entwicklung eines Medikaments eine Rolle spielen, welches bei der Behandlung von neurologischen Krankheiten angewendet wird [21].

Der erste Ansatz auf der Suche nach solchen Substanzen ist der ethnopharmakologische Hintergrund einer Pflanze. Bestehen bereits in alten Lehrbüchern und Pharmakopöe beschriebene Daten zu Pflanzen, die bei neurologischen Beschwerden oder bei altersbezogenen Gedächtnisproblemen eingesetzt werden, so besteht der begründete Verdacht, dass diese Substanzen auch eine Wirkung in Bezug auf die Neurogenese zeigen. Weiterhin spielt eine Rolle, ob bereits medizinische Untersuchungen zu Substanzen bestehen, welche möglicherweise in Verbindung mit der Neurogenese gebracht werden können. Dieser zweite Ansatz auf der Suche nach differenzierungsinduzierenden Substanzen hat bereits vielversprechende Ergebnisse geliefert. So wirken beispielsweise verschiedene Antidepressiva neurodifferenzierend [23]. Da für Antidepressiva bereits bekannt ist, dass diese eine Wirkung auf Neurotransmitter haben, welche die Übertragung von Informationen und Signalen zwischen Nervenzellen steuern, ist der Zusammenhang zu den Neuronen gegeben [24]. Somit sind bereits getätigte medizinische Untersuchungen ein guter Anhaltspunkt zur Untersuchung der Neurodifferenzierung. Als dritter wichtiger Ansatz bei der Suche nach Substanzen, die die Neurogenese auslösen, ist die strukturelle Beschaffenheit dieser zu nennen. Wichtig hierfür ist, dass die Substanzen in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Somit würden die Substanzen in die Nähe der Stammzellen gelangen und können anschließend wirken. Weiterhin besteht der Verdacht bei antiproliferativ wirkenden Substanzen, dass die Differenzierung stets mit dem Verlust der Teilungsfähigkeit einhergeht.

Als Beispiel für den ersten Ansatz wurde die Pflanze *B. monnieri* gewählt. Durch die Nutzung der Pflanze *B. monnieri* in der indischen Medizin zur Behandlung von neurologischen Altersbeschwerden ist der ethnopharmakologische Hintergrund abgedeckt. Im Ayurveda, welches einen ganzheitlichen Ansatz der Kenntnisse von Leben, Gesundheit und Heilung umfasst, wird *B. monnieri* angewendet, um die „Hirnleistung“ zu stärken [25, 26]. Dadurch wird es in die Gruppe „Medhya Rasayana“ (Anwendung zur Gedächtnissteigerung und Verjüngung) und in die Gruppe „Aindra Rasayana“ (Anwendung zur Langlebigkeit und zur Fruchtbarkeitsförderung) eingeordnet [27, 28]. Weiterhin wird es im Ayurveda als Antiasthmatikum, Kardiotonikum und Analgetikum angewendet [26]. Es ist beschrieben, dass keine bestimmten Teile der Pflanze für die medizinische Wirkungen zuständig sind [26]. Das getrocknete Pflanzenmaterial der ganzen Pflanze wird zur Herstellung der Heilmittel verwendet [26]. Außerdem wird *B. monnieri* im Ayurveda gegen verschiedenste neurologische Krankheitsbilder angewendet, beispielsweise bei Angstzuständen, bei Schlaflosigkeit, bei Konzentrationsschwäche, bei Epilepsie, bei Psychosen und bei Stressbelastungen [26, 29]. Die Pflanze wird jedoch auch zur Behandlung von Krankheiten der Atemorgane, des Herz-Kreislauf-Systems, der Verdauungsorgane, der Nieren, der Haut, des Muskel-Skelett-Systems und des Immunsystems verwendet [26]. In der Literatur gibt es Untersuchungen, dass die Einnahme eines Extraktes von *B. monnieri* als Schutz vor der Gabe eines Neurotoxins die Dichte von Neuronen in verschiedenen Regionen des Gehirns mindestens auf dem Level der unbehandelten Kontrolle hält [30].

Weiterhin gibt es bereits Untersuchungen, welche beschreiben, dass ein Extrakt von *B. monnieri* bei depressiven Ratten zur erhöhten Expressierung eines Markerproteins (DCX) der Neurogenese führt [31]. Dabei wird ein Extrakt verwendet, in welchem die Substanzklasse der Bacoside angereichert ist [31]. Durch die Existenz dieser Literaturstellen ist die Pflanze *B. monnieri* und ihre Inhaltsstoffe, besonders die Bacoside, in den Vordergrund des Forschungsinteresses gerückt. Weiterhin ist die in *B. monnieri* enthaltene Substanzklasse der Bacoside aufgrund ihres amphiphilen Charakters von Interesse, da diese möglicherweise die Blut-Hirn-Schranke besser passieren können.

Eine weitere Substanzklasse sind die Indolalkaloide, für die vor allem der dritte Ansatz der interessanten strukturellen Beschaffenheit gilt. Bei manchen Indolalkaloiden ist jedoch auch gleichzeitig ein ethnopharmakologischer Hintergrund gegeben. Die chronisch myeloische Leukämie wird seit mehreren Jahrhunderten mit einem aus der traditionellen chinesischen Medizin bekannten Rezept namens Danggui Longhui Wan behandelt [32]. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus elf verschiedenen Pflanzen, wobei die Aktivität erst im letzten Jahrhundert dem Qing Dai zugeordnet wurde [32]. Qing Dai ist eine Mischung zweier Farbstoffe, welche größtenteils das blaue Indigo und zu kleineren Teilen ein Isomer des Indigo, das rote Indirubin enthält [32]. Da bereits medizinische Untersuchungen zu den Indigofarbstoffen vorliegen, ist auch der zweite Ansatz bei der Suche nach differenzierungsinduzierenden Substanzen erfüllt. Neuere Untersuchungen aus dem Jahr 1999 ergaben, dass Indirubin und deren Derivate Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) inhibieren und den Zellzyklus beeinflussen, indem diese die Proliferation inhibieren [32]. Da auch bei der Reifung der jungen Neuronen ein Proliferationsstopp eintritt, ist die Untersuchung dieser Substanzen in Richtung Differenzierungsinduktion von großem Interesse. Neben der Inhibierung der Proliferation werden Indirubine sowohl als Inhibitoren der CDK1 und CDK5 als auch der Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) beschrieben, welche an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind [33, 34]. Die beiden Kinasen spielen eine Rolle bei der Erforschung von Alzheimer [33]. Außerdem ist die Glykogensynthase-Kinase-3 bei der Ausbildung axonaler Ausläufer beteiligt [33, 35]. Ein Indirubinderivat, das 6-Bromo-indirubin-3'-oxim zeigte bereits eine neurodifferenzierende Wirkung auf humane neuronale Vorläuferzellen [36]. Neben den medizinisch bereits bekannten Aspekten sind die Indirubine interessant, da eine Modifikation der Seitengruppen eine erhöhte Wasserlöslichkeit bieten könnte.

Indolactam und dessen Derivate, bei denen es sich um in Blaualgen und Bakterien vorkommende Indolderivate handelt, bieten eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Indirubinen und sind aufgrund ihrer bereits patentierten neuroprotektiven Eigenschaften in den Forschungsfokus gerückt [37]. Hierdurch ist auch der zweite Ansatz auf der Suche nach differenzierungsinduzierenden Substanzen abgedeckt. Ein ethnopharmakologischer Hintergrund ist diesen Substanzen nicht zuzuschreiben, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Indirubine und die Indolactame einen strukturell-ähnlichen Pharmakophor besitzen, welcher die Aktivität

dieser Moleküle begründen könnte. Somit ist der dritte Ansatz für ein Screening bei den Indolactamen auch abgedeckt, da es sich hierbei um strukturell sehr interessante Substanzen handelt.

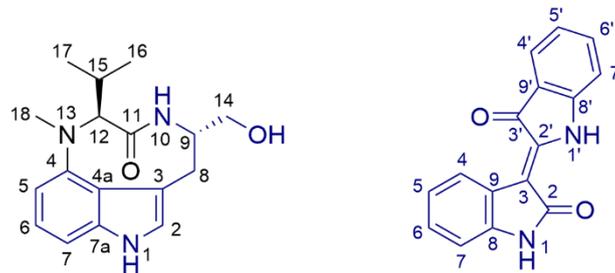


Abbildung 2: Darstellung von Indolactam (links) und Indirubin (rechts) mit ihren strukturellen Ähnlichkeiten (blau), welche möglicherweise den gemeinsamen Pharmakophor darstellen.

Abbildung 2 zeigt Indolactam und Indirubin sowie ihre strukturellen Ähnlichkeiten, wobei Indolactam in seinem möglichen Pharmakophor, der als 3-Indolderivat angenommen wird, ein C-Atom mehr (Bindung zwischen 3, 8, 9) aufweist als das Indirubin (Bindung zwischen 3 und 2'). Trotzdem ist eine sehr große strukturelle Formähnlichkeit aufgrund des Indolgrundgerüsts gegeben. Außerdem sind die Substituenten in beiden Molekülen eine Amidgruppe und im Falle von Indolactam ist der Sauerstoff in einer Hydroxygruppe gebunden und bei Indirubin liegt eine Oxoverbindung mit dem Kohlenstoff vor. Neben der Strukturähnlichkeit der beiden Indolalkaloide ist bereits eine differenzierungsinduzierende Aktivität für Indolactam beschrieben, wobei es sich hierbei um die Differenzierung in Pankreaszellen handelt [38]. Aufgrund der vielen strukturellen Ähnlichkeiten ist es erstrebenswert, eine Struktur-Aktivitätsbeziehung zwischen aktiven und inaktiven Indolalkaloiden in Bezug auf die differenzierungsinduzierende Aktivität aufzustellen.

Im Folgenden werden Extrakte der Pflanze *B. monnieri* auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Die in den Extrakten enthaltenen Substanzen werden mit käuflich erwerbbaaren Reinsubstanzen verglichen, um Gehalte zu bestimmen. Durch die durchgeführten Vergleiche mit Referenzsubstanzen können auch Ungereimtheiten bei beschriebenen Strukturen geklärt werden. Außerdem wird die differenzierungsinduzierende Aktivität dieser Extrakte, Reinsubstanzen und der beschriebenen Indolalkaloide mit Hilfe eines dualen Luciferase-Assays getestet.

2 Stand des Wissens zu geriatrisch aktiven Heilpflanzen und neuroaktiven Naturstoffen

2.1 *Bacopa monnieri*

Die Pflanze *B. monnieri* L. (BM), welche auch unter den beiden Namen Brahmi oder das kleine Fettblatt bekannt ist, gehört zur Familie der Plantaginaceae [29, 39]. Die Pflanze ist bitter schmeckend, sukkulent und besitzt lange, kleine Blätter, viel Geäst und weiße bis hellblaue Blüten [40]. Brahmi wächst vor allem in den schattigen, trockenen und leicht sumpfigen Gebieten in subtropischen und tropischen Bereichen in Europa, den vereinigten Staaten, Australien und Asien, vorwiegend in Indien [41-43]. In diesen Regionen wächst die ayurvedisch genutzte Kulturpflanze im Bereich des Meeresspiegels bis in Höhen knapp über 1000 m [44]. Aufgrund der altertümlichen Beschreibung der Pflanze im Ayurveda gibt es auch eine mögliche andere Quelle für Brahmi, wobei es sich um *Centella asiatica* handelt [45]. Im Folgenden wird Brahmi als Synonym für *B. monnieri* verwendet.



Abbildung 3: Die Pflanze *B. monnieri* (eigene Aufnahme).

B. monnieri ist für die vielen enthaltenen Bestandteile, wie beispielsweise Alkaloide, Saponine, Flavonoide, Triterpene, Phenylethanoidglykoside und Phytosterole bekannt [46]. In ayurvedischen Arzneibüchern wird die Pflanze Brahmi beschrieben und seit Jahrtausenden auch verwendet [26]. In vielen ayurvedischen Heilmitteln wird der Extrakt zur Stärkung des Denkvermögens und gegen Konzentrationsstörungen, epileptische Störungen und Angstzustände verwendet [26]. Des Weiteren werden die Eigenschaften von *B. monnieri* als entzündungshemmend, schmerzlindernd, hepato- und neuroprotektiv und beruhigend beschrieben [47]. Brahmi wird überwiegend für medizinische Zwecke kultiviert [48]. Einer indischen Studie zufolge ist *B. monnieri* aufgrund von medizinischem, kommerziellem und forschungsbegründetem Interesse die

zweitwichtigste medizinische Pflanze [46]. In der westlichen Medizin findet Brahmi keine Anwendung, wobei einige neuere Nahrungsergänzungsmittel *B. monnieri* enthalten [26]. Die gründliche biomedizinische Untersuchung von *B. monnieri* steckt jedoch erst in den Anfängen [46].

2.1.1 Inhaltsstoffe von *Bacopa monnieri*

Saponine

Als Saponine werden sekundäre Metaboliten aus dem Triterpenstoffwechsel bezeichnet, welche überwiegend in Pflanzen und gelegentlich auch in Meerestieren vorkommen [49-51]. Bei diesen Glykosiden sind eine oder mehrere polare Zuckereinheiten mit einem lipophilen Aglykon, auch Sapogenin genannt, verbunden [50]. Ein Hauptmerkmal der Saponine ist die Bildung von stabilem Schaum, wenn diese in Wasser gelöst sind, weshalb sie auch als natürliche Tenside bezeichnet werden [52, 53]. Dies war auch für die Namensgebung von Bedeutung, was sich im lateinischen Begriff „sapo“, welcher mit dem deutschen Begriff „Seife“ übersetzt werden kann, widerspiegelt [49]. Die bereits durch ihren Namen angedeutete Oberflächenaktivität ist die einzige Eigenschaft, die für alle Saponine gilt, alle weiteren Eigenschaften sind einzelnen Saponinen bzw. Saponingruppen zugeordnet [50]. Neben Polyphenolen werden Saponinen die größten biologischen Effekte in der traditionellen chinesischen Medizin zugeschrieben [54]. Die Vielzahl pharmakologischer Anwendungen von Saponinen ist durch die enorme Variabilität der Strukturen dieser Verbindungen gegeben [55]. Bei Saponinen wird zwischen drei großen Gruppen unterschieden, den Steroidsaponinen (C_{27} -Grundgerüst), den Steroidalkaloidsaponinen (C_{27} -Grundgerüst und enthaltener Stickstoff) und den Triterpensaponinen (C_{30} -Grundgerüst) [50]. Des Weiteren wird zwischen monodesmosidischen, bidesmosidischen und tridesmosidischen Saponinen unterschieden, je nach Anzahl der Zuckerketten, die sich am gebundenen Aglykon befinden [56]. Die in der Pflanze *B. monnieri* charakteristisch vorkommenden Saponine sind Triterpensaponine und werden auch Bacoside oder Bacopasaponine genannt [57]. Diese Triterpensaponine sind vom Dammarantyp [41]. Als Aglykon besitzen die in *B. monnieri* vorkommenden Bacoside entweder Jujubogenin oder Pseudojujubogenin und unterscheiden sich in der Position einer Isobutylenseitengruppe [58, 59].

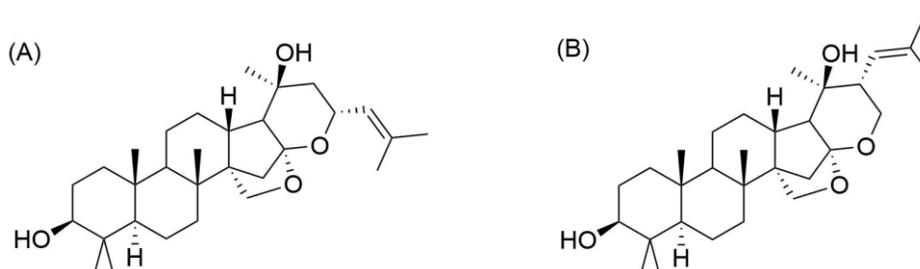


Abbildung 4: Darstellung der beiden strukturisomeren Aglyka der Bacoside der Pflanze *B. monnieri* Jujubogenin (A) und Pseudojujubogenin (B).

Extrakte der Pflanze *B. monnieri* werden oftmals als Nahrungsergänzungsmittel verwendet, um das Gedächtnis zu stärken [60, 61]. Die Aktivität wird hauptsächlich den Bacosiden zugeordnet, welche vorwiegend als Mischung zweier übergeordneter Bacosidgemische, Bacosid A und Bacosid B, beschrieben werden [60]. Bacosid A ist eine Mischung aus vier Bacosiden: Bacosid A3, Bacopasid II, Bacopasid X und Bacopasaponin C [62]. Bei Bacosid B gehen die Literaturdaten weit auseinander und es herrscht Uneinigkeit über die Strukturen [62].

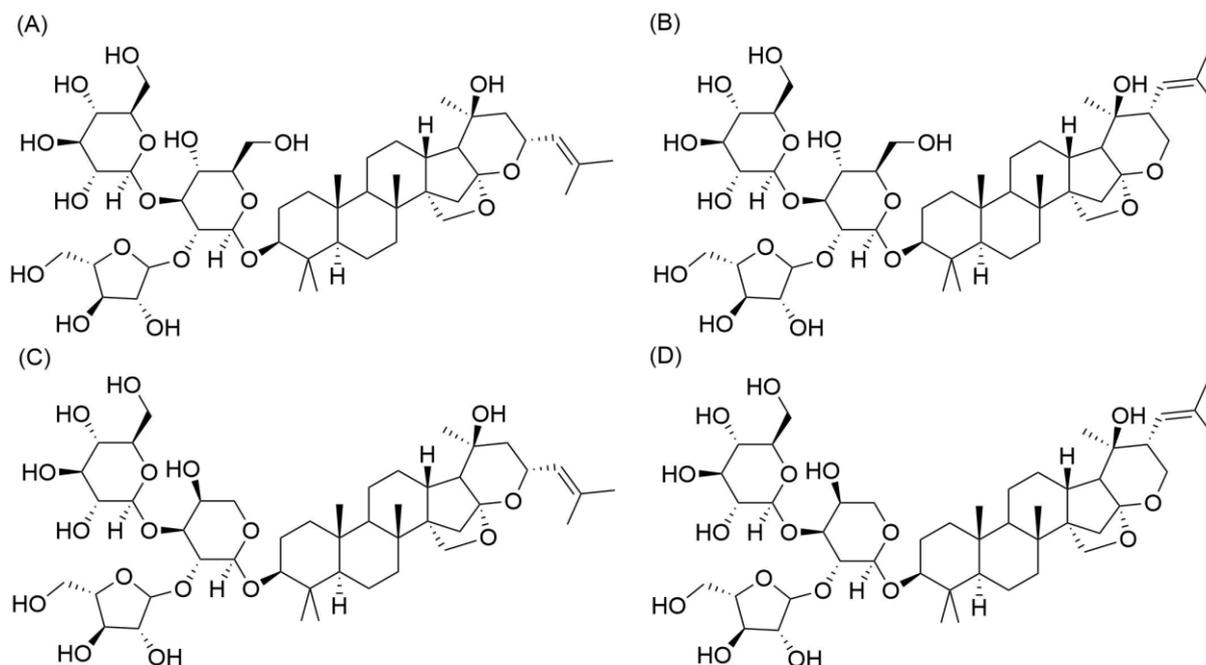


Abbildung 5: Darstellung der einzelnen Strukturen des in *B. monnieri* enthaltenen Saponingemisches Bacosid A: Bacosid A3 (Jujubogenin-Aglykon) (A), Bacopasid II (B) (Pseudojujubogenin-Aglykon), Bacopasid X (C) (Jujubogenin-Aglykon) und Bacopasaponin C (Pseudojujubogenin-Aglykon) (D).

Abbildung 5 zeigt die vier in *B. monnieri* enthaltenen Bacoside, wobei es sich um monodesmosidische Saponine handelt [59]. Die Unterschiede der Strukturen liegen in den unterschiedlich gebundenen Zuckern an den beiden Aglyka [59]. Bei Bacosid A3 und Bacopasid II bestehen die gebundenen Zuckereinheiten aus einer α -L-Furanosyleinheit und zwei β -D-Glucopyranosyleinheiten [60]. Die Zuckereinheiten bei Bacopasid X und Bacopasaponin C setzen sich aus einer α -L-Furanosyleinheit, einer β -D-Glucopyranosyleinheit und einer α -L-Arabinopyranosyleinheit [60]. Dadurch gibt es je zwei Paare an Strukturisomeren, wobei es sich zum einen um Bacosid A3 und Bacopasid II (jeweils $C_{47}H_{76}O_{18}$) und zum anderen um Bacopasid X und Bacopasaponin C (jeweils $C_{46}H_{74}O_{18}$) handelt. Viele pharmakologische Studien beruhen auf der Untersuchung von Bacosid A, wobei beschrieben wird, dass die Aktivität der Saponine vom Aglykon und den gebundenen Zuckereinheiten abhängt [49]. Dabei wurde Bacosid A in Hinblick auf seine neuropharmakologische, antidepressive, antioxidative, hepatoprotektive und gastrointestinale Effekte untersucht [59].

Flavonoide

Flavonoide sind Sekundärmetabolite, die in vielen Pflanzen vorkommen [63, 64]. Eine Gemeinsamkeit aller Flavonoide ist, dass diese aus einem Grundgerüst von 15 Kohlenstoffatomen bestehen, wobei zwei aromatische Sechsringe über eine C₃-Brücke miteinander verbunden sind [65, 66]. Die Ringe werden als A, B und C Ring bezeichnet (Abbildung 6) [65]. Flavonoide sind in folgende Untergruppen unterteilt: Chalkone, Flavanone, Flavone und Flavonole, Anthocyane, Proanthocyanidine [66]. Zur Stoffgruppe der Flavone gehören auch Apigenin und Luteolin, welche sich in der Anzahl der gebundenen Hydroxygruppen an das Flavongrundgerüst unterscheiden und unter anderem Bestandteil von *B. monnieri* sind (Abbildung 6) [66-68].

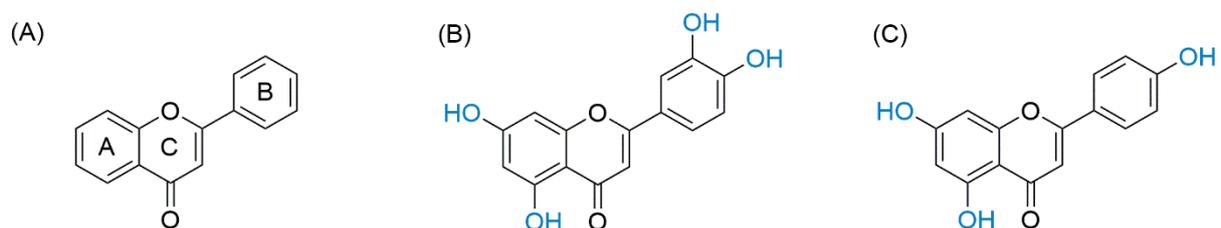


Abbildung 6: Darstellung des Flavongrundgerüsts (A) und der beiden im Folgenden untersuchten und in *B. monnieri* vorkommenden Flavonoide Luteolin mit vier gebundenen Hydroxygruppen an das Flavongrundgerüst (B) und Apigenin mit drei gebundenen Hydroxygruppen an das Flavongrundgerüst (C).

Flavonoide kommen sowohl wie dargestellt als Aglykone vor, oftmals jedoch auch als Flavonoidglykoside, wobei meist eine oder zwei Zuckereinheiten an das Grundgerüst gebunden sind [69, 70]. Als gebundene Zuckereinheiten sind folgende Monosaccharide bekannt: D-Glucose, D-Galactose, D-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure, D-Xylose, D-Apiose, L-Rhamnose und L-Arabinose [70]. Dabei werden die wichtigsten monosidischen Flavonoide mit den Aglyka Luteolin und Apigenin gebildet [70]. Als erstes Flavonoidglykosid in *B. monnieri* wurde Luteolin-7-glucosid beschrieben (Abbildung 7) [71].

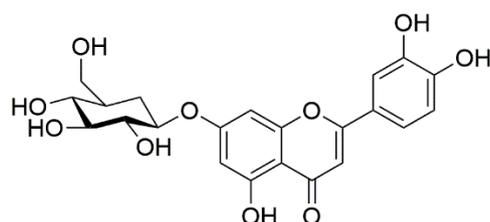


Abbildung 7: Darstellung des im Folgenden untersuchten und in *B. monnieri* vorkommenden Flavonoidglykosides Luteolin-7-glucosid.

Neben den dargestellten Strukturen werden in *B. monnieri* noch Quercetin, Wogonin, Wogonin-7-glucuronid, Luteolin-7-glucuronid und Apigenin-7-glucuronid beschrieben [46, 48, 67]. Dadurch, dass Flavonoide unter anderem häufig in Nahrungsmitteln wie Früchten, Gemüse

und Getränken vorkommen, ist deren pharmakologische Wirksamkeit von Interesse [72]. Dabei werden den Flavonoiden antioxidative, antiinflammatorische, antitumoröse, antithrombogene, antiarteriosklerotische, antivirale, antimikrobielle, antibakterielle, antifungale, antidiabetische, antiinflammatorische, hepato- und kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben [65, 69, 72].

Triterpene

Als Triterpene werden Naturstoffe mit einem C_{30} -Grundgerüst aus Isopreneinheiten bezeichnet, welche häufig in Pflanzen vorkommen [51]. Dabei werden die Triterpene in eine Vielzahl an Untergruppen unterteilt, wobei die Untergruppe der Lupane als biologisch aktiv gelten [51, 73]. Lupane haben ein pentacyclisches Grundgerüst bestehend aus vier Sechsringen und einem Fünfring mit sechs gebundenen Methylgruppen und einer Isopropylgruppe (Abbildung 8 (A)). Zu dieser Gruppe der Lupane gehören unter anderem auch die Betulinsäure und das Bacosin, welche in *B. monnieri* enthalten sind [74, 75]. Bei beiden Substanzen Betulinsäure und Bacosin ist eine der sechs Methylgruppen zu einer Säuregruppe oxidiert, eine Hydroxygruppe gebunden und die Isopropylgruppe zu einer Isopropenylgruppe reduziert ist (Abbildung 8 (B) und (C)).

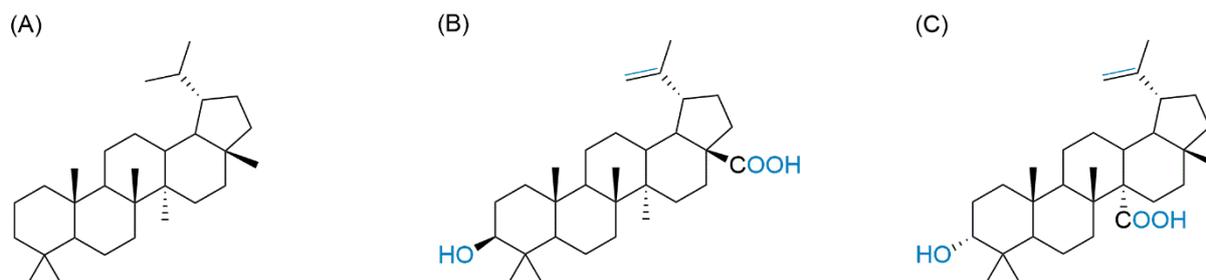


Abbildung 8: Darstellung des Lupangrundgerüsts (A) und der im Folgenden untersuchten und in *B. monnieri* beschriebenen Triterpene Betulinsäure (B) und Bacosin (C) (schwarz mit blauen Modifikationen im Vergleich zum Lupangrundgerüst).

Die biologischen Aktivitäten der Triterpene reichen von antiinflammatorischer Aktivität bis zu einer krebsbekämpfenden Aktivität [73], wobei die pharmakologischen Eigenschaften der dargestellten Triterpene im Weiteren genauer diskutiert werden (Kapitel 4.4).

2.1.2 (Neuro)-pharmakologische Eigenschaften von *Bacopa monnieri*

B. monnieri gilt in der Ayurvedischen Medizin als Heilmittel bei altersbedingten Denk- und Erinnerungsschwächen und wird verstärkt auch in Europa als Nahrungsergänzungsmittel kom-

merziell verbreitet, um die Gedächtnisleistung zu unterstützen. Jüngst werden vermehrt Studien zu den pharmakologischen Eigenschaften von *B. monnieri* durchgeführt, welche im Folgenden zusammengefasst sind.

Leistungssteigernde Wirkung

Da es zur ZNS-steigernden Wirkung von *B. monnieri* Extrakt (BME) sowohl Tierstudien als auch Humanstudien gibt, werden im Folgenden ausschließlich die humanen placebo-kontrollierten Doppelblindstudien beschrieben, welche den reinen Extrakt von Brahmi ohne weitere Inhalts- oder Zusatzstoffe untersuchen.

Stough et al. haben 2001 die erste placebo-kontrollierte Doppelblindstudie veröffentlicht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von zwei Kapseln BME (KeenMind®, 150 mg, Gehalt von mindestens 55 % Bacosiden) über zwölf Wochen signifikant positive Effekte auf Teilbereiche der kognitiven Fähigkeiten von gesunden Probanden (18-60 Jahre) hat. Die Probanden wurden vor der Einnahme des Extraktes bzw. des Placebos in 16 verschiedenen Tests neuropsychologisch untersucht. Anschließend haben die Studienteilnehmer über zwölf Wochen die Kapseln eingenommen, wobei die erste weitere Testung nach fünf Wochen und die abschließende Testung nach zwölf Wochen stattfand. Nach den zwölf Wochen konnte gezeigt werden, dass der Extrakt gegenüber dem Placebo eine signifikant positive Wirkung auf die Geschwindigkeit von Prozessen der visuellen Wahrnehmung hat. Des Weiteren zeigt der Extrakt signifikante Effekte auf die Lern- und Vergessensraten und die Gedächtniskonsolidierung. Signifikant bedeutet $p < 0,05$ [76]. Kritisch zu sehen ist jedoch, dass hier nur eine Gegenüberstellung der Wirkung des Extraktes gegenüber dem Placebo zu den jeweiligen Zeitpunkten gemacht wird. Die Werte der Probanden mit Einnahme des Extraktes vor Beginn der Studie, während und nach der Studie werden jedoch nicht miteinander verglichen und statistisch ausgewertet. Hier kann jedoch auch ein sichtlicher Erfolg in den genannten Bereichen erkannt werden, soweit die Werte an unterschiedlichen Testzeitpunkten miteinander vergleichbar sind.

Nathan et al. haben im selben Jahr eine Studie veröffentlicht, in der die akute neuropsychologische Wirkung von zwei Kapseln BME (KeenMind®, 150 mg, Gehalt von mindestens 55 % Bacosiden) oder Placebo auf gesunde Probanden (18-60 Jahre) untersucht wurde. Dabei wurden vor und zwei Stunden nach der Einnahme der Kapseln Tests zur auditiv-verbale Erinnerung, zum Kurzzeitgedächtnis, zur kognitiven Fähigkeit und zur Reaktions- und Inspektionszeit gemacht, wobei jedoch keine signifikanten ($p < 0,05$) Verbesserungen zu erkennen waren [77].

Roodenrys et al. haben in einer Studie von 2002 beschrieben, dass die gesunden Teilnehmer (40-65 Jahre), die über drei Monate BME (KeenMind®) einnahmen und auf ihre Aufmerksamkeit, ihre Leistungsfähigkeit, ihr Kurzzeitgedächtnis, ihr Erinnerungsvermögen und ihren psychologischen Zustand mittels 18 Tests untersucht worden sind, nur einen signifikant ($p < 0,05$)

positiven Effekt im Langzeitgedächtnis für Wörter direkt nach Ende der dreimonatigen Extraktgabe gezeigt haben. Dabei wurden die Personen vor der Studie, direkt nach der letzten Einnahme und sechs Wochen nach der letzten Einnahme untersucht. Die Studie vergleicht sowohl die Placebo- und die Extraktgruppe als auch die Extraktgruppe zu den unterschiedlichen Messpunkten. Alle weiteren Tests zeigten keine signifikanten Verbesserungen. Die Dosierung war hier ähnlich wie in der bereits beschriebenen Studie, Personen unter 90 kg haben 300 mg Extrakt pro Tag eingenommen, Personen über 90 kg 450 mg Extrakt pro Tag [78].

In einer weiteren Studie von Raghav et al. von 2006 wurde die Wirkung eines standardisierten BME (Central Drug Research Institute, Gehalt von mindestens 55 % Bacosiden) bei Menschen über 55 Jahren mit altersbedingter Gedächtnisschwäche untersucht. Dabei haben die Probanden über zwölf Wochen zwei Kapseln des Extraktes (125 mg) oder des Placebos eingenommen. Anschließend haben beide Testgruppen für weitere vier Wochen das Placebo eingenommen. Die Untersuchungen der Teilnehmer erfolgten vor Beginn der Studie, nach vier, acht, zwölf und 16 Wochen. Dabei wurde ein Testverfahren der neuropsychologischen Diagnostik angewendet, bei welchem die mentale Kontrolle, das logische Gedächtnis, das Kurzzeitgedächtnis, die visuelle Wiedergabe, die verbale Paarerkennung und die Gesamtgedächtnisleistung untersucht wurden. Dabei hatte der Extrakt auf die mentale Kontrolle ($p < 0,01$ nach zwölf Wochen), das logische Gedächtnis ($p < 0,01$ nach vier, acht und zwölf Wochen), das Kurzzeitgedächtnis ($p < 0,05$ nach zwölf Wochen), die verbale Paarerkennung ($p < 0,01$ nach acht und zwölf Wochen) und die Gesamtgedächtnisleistung ($p < 0,05$ nach vier Wochen, $p < 0,01$ nach acht und zwölf Wochen) einen signifikant positiven Einfluss. Diese Studie stellt auch die signifikanten Anstiege in der Placebogruppe dar, welche jedoch im Vergleich mit der BME Gruppe deutlich weniger signifikant waren [79].

Stough et al. haben im Jahr 2008 in einer weiteren Studie die Untersuchung der Wirkung von zwei Kapseln BME (KeenMind®, 150 mg, Gehalt von mindestens 55 % Bacosiden) auf gesunde Studienteilnehmer (18-60 Jahre) über 90 Tage vorgenommen. Dabei wurden die Teilnehmer der Studie vor Studienbeginn und nach Studienende auf fünf kognitive Faktoren und die visuelle Informationsverarbeitung untersucht. Ergebnis dieser Studie war, dass der Extrakt auf die fünf kognitiven Faktoren untersucht nur signifikant ($p < 0,05$) positive Effekte auf das Arbeitsgedächtnis gezeigt hat. In der visuellen Informationsverarbeitung zeigte die Extraktgruppe auch signifikant ($p < 0,05$) positive Verbesserungen [80].

Eine weitere Studie aus dem gleichen Jahr wurde von Barbhaiya et al. durchgeführt. Dabei wurde die Wirkung der täglichen Einnahme einer Kapsel eines BME (BacoMind™, 450 mg) oder eines Placebos bei älteren Menschen (50-75 Jahre) mit Gedächtnisschwäche über zwölf Wochen untersucht, wobei eine Reihe an auditiven und visuellen neuropsychologischen Tests durchgeführt wurde. Untersucht wurden die Probanden jeweils vor Beginn und nach Ende der täglichen Einnahme und im Anschluss nochmal zwölf Wochen nach der letzten Einnahme. Die

Untersuchung der Aufmerksamkeit erfolgte mittels sechs verschiedener Untersuchungen, wobei nur eine Untersuchung zum Kurzzeitgedächtnis signifikant ($p < 0,01$) verbesserte Aufmerksamkeit im Vergleich zwischen den beiden Gruppen und den unterschiedlichen Messpunkten zeigte. Bei der Untersuchung der verbalen Gedächtnisleistung mittels zehn Tests haben die Probanden in drei Tests durch die Einnahme des Extraktes eine signifikant ($p < 0,05$) verbesserte Leistung verglichen mit der Placebogruppe und den verschiedenen Messzeitpunkten gezeigt. Der Test zur Geschwindigkeit der Informationsaufnahme ergab keinen signifikant positiven Effekt durch die Einnahme im Vergleich zur Placebogruppe und den Messzeitpunkten [81].

Calabrese et al. haben im Jahr 2008 die Wirkung eines BME auf gesunde Studienteilnehmer über 65 Jahren untersucht. Dabei haben die Teilnehmer zuerst über sechs Wochen ein Placebo und anschließend über zwölf Wochen BME (MediHerb Pty. Ltd., 300 mg, Gehalt von mindestens 50 % Bacosid A und B) oder Placebo einmal täglich eingenommen. Mehrere Lern- und Merkfähigkeitstests wurden vor und nach der sechswöchigen Einnahme des Placebos, nach der zwölfwöchigen Einnahme des Placebos oder des BME und sechs Wochen nach Ende der Studie durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Extrakt bei den Probanden eine signifikant ($p < 0,01$) positive Wirkung auf die Reaktionszeit hat. Keine Effekte zeigte die Einnahme des Extraktes auf die Probanden bei der direkten Wiedergabe von Wörtern, bei einer geteilten Aufmerksamkeitsaufgabe und bei einem Gedächtnistest [82].

Morgan und Stevens haben in einer Studie von 2010 die Wirkung von BME auf Menschen über 55 Jahre untersucht. Dabei haben die gesunden Probanden einmal täglich entweder ein Placebo oder BME (BacoMind™, 300 mg, Gehalt von 40-50 % Bacosiden) über eine Dauer von zwölf Wochen eingenommen. Dabei wurden insgesamt 21 neuropsychologische Tests durchgeführt, welche die auditiv-verbale, die visuell-räumliche und die subjektive Erinnerung untersucht habe. Dabei zeigte die Einnahme des Extraktes auf weniger als die Hälfte der auditiv-verbale Tests einen signifikant ($p < 0,05$) positiven Effekt, auf die visuell-räumliche und die subjektive Erinnerung hatte die Einnahme des Extraktes keinen Effekt [83].

In einer Studie von Peth-Nui et al. von 2012 wurde die Wirkung eines BME auf gesunde, ältere Probanden mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren über einen Einnahmezeitraum von zwölf Wochen untersucht. Dabei wurden drei verschiedene Gruppen untersucht: eine Placebogruppe und zwei Extraktgruppen, die entweder 300 mg oder 600 mg BME (Gehalt von 5 % Bacosiden) täglich eingenommen haben. Die Gruppen wurden vor der Einnahme, nach vier, nach acht, nach zwölf und nach 16 Wochen untersucht. Es wurden Tests zum Arbeitsgedächtnis, im Detail zur Aufmerksamkeitsleistung, zur Dauer der Aufmerksamkeit, zur Qualität und zur Reaktionszeit gemacht. Außerdem wurden Untersuchungen zur Potentialanalyse und zur Bestimmung der Aktivität der Acetylcholinesterase und der Monoaminoxidase gemacht. Das Ergebnis der Studie zeigt, dass die Einnahme von 300 mg BME pro Tag einen signifikant ($p < 0,001$ nach vier, acht und 16 Wochen, $p < 0,01$ nach zwölf Wochen) positiven Effekt auf

die Qualität des Arbeitsgedächtnisses hat, wohingegen die Einnahme von 600 mg BME keinen signifikant positiven Effekt zeigt. Außerdem zeigt die Einnahme des BME signifikante (300 mg: $p < 0,05$ nach acht Wochen und $p < 0,01$ nach zwölf und 16 Wochen; 600 mg: $p < 0,05$ nach acht Wochen und $p < 0,01$ nach vier, zwölf und 16 Wochen) Effekte auf die Reaktionszeit. Im Enzephalogramm wurden signifikant (mind. $p < 0,05$) positive Effekte der Einnahme von 300 mg und 600 mg BME auf die Latenzzeit in zwei unterschiedlichen Tests nach zwölf Wochen bestimmt. Somit hat die Einnahme des Extraktes im Vergleich zur Placebogruppe positive Auswirkungen auf die Leistungsgeschwindigkeit, wodurch die Zeit zwischen dem Reiz und der Reizantwort verkürzt ist. Die Untersuchungen der Aktivität der Acetylcholinesterase und der Monoaminoxidase wurden gemacht, da beide Transmitter eine Rolle bei Aufmerksamkeits- und Denkprozessen spielen. Auch hier zeigt die Einnahme von 300 mg und 600 mg BME einen signifikant (300 mg: $p < 0,01$ nach vier und 16 Wochen, $p < 0,001$ nach acht und zwölf Wochen, 600 mg: $p < 0,01$ nach zwölf und 16 Wochen) positiven Effekt auf die Reduktion der Acetylcholinesteraseaktivität. Ein Effekt auf die Aktivität der Monoaminoxidase durch die Einnahme des Extraktes konnte nicht nachgewiesen werden [84].

Eine Studie von Sathyanarayanan et al. aus dem Jahr 2013 untersucht die Wirkung der täglichen Einzeldosis von 450 mg BME (Bacomind™) im Vergleich zur Einnahme eines Placebos über eine Einnahmedauer von zwölf Wochen bei gesunden Probanden (35-60 Jahre). Dabei wurde vor Beginn und nach Ende der Einnahme eine Reihe an kognitiven Tests durchgeführt. Dazu zählten ein verbaler Lerntest, zwei verschiedene Informationsverarbeitungstests und ein Aufmerksamkeitstest. Die Einnahme des Extraktes zeigte im Vergleich zum Placebo keine signifikanten Effekte [85].

In einer weiteren Studie von Downey et al. aus demselben Jahr wurden die akuten Effekte der Einnahme eines BME (Keenmind®, 320 mg oder 640 mg, Gehalt von 55 % Bacosiden) im Vergleich zu einem Placebo auf gesunde Erwachsene (18-56 Jahre) untersucht. Dabei wurden Untersuchungen zu kognitiven Fähigkeiten und zur Verarbeitung von Informationen zwei Stunden nach der Einnahme gemacht. Außerdem wurden Vitalwerte der Probanden untersucht. Dabei zeigte keine der durchgeführten Untersuchungen signifikante Verbesserungen durch die Einnahme des Extraktes [86].

Benson et al. haben 2014 eine Studie zur Untersuchung der akuten Effekte nach der Einnahme eines BME (Keenmind®, 320 mg oder 640 mg, Gehalt von 55 % Bacosiden) im Vergleich zu einem Placebo bei gesunden Erwachsenen (18-44 Jahre) eine und zwei Stunden nach Einnahme veröffentlicht. Dabei wurden kognitive Fähigkeiten wie Kopfrechnen, Farb-Wort-Interferenzneigung, Wortsuche und die visuelle Verfolgung untersucht. Die Einnahme des Extraktes zeigte sowohl auf die Farb-Wort-Interferenzneigung (640 mg BME: nach einer und nach zwei Stunden, 320 mg BME: nach einer Stunde) als auch auf die Wortsuche (320 mg BME: nach einer und nach zwei Stunden) signifikant ($p < 0,05$) positive Effekte [87].

Kumar et al. haben 2016 eine weitere Studie zur Untersuchung der kognitiven Fähigkeiten von Probanden mit einer zweifachen Einnahme eines BME (Bacognize®, 150 mg, Gehalt von 45 % Bacosiden) oder eines Placebos pro Tag über 45 Tage veröffentlicht. Dabei wurden gesunde Studenten (19-22 Jahre) vor Beginn und nach Ende der Studie neuropsychologisch teils mittels computergestützten Tests untersucht. Dabei zeigte die Einnahme des BME auf zwei von zehn durchgeführten Untersuchungen signifikant ($p < 0,05$) positive Effekte verglichen zum Placebo, zum einen auf die logische Denkweise und zum anderen auf die Fähigkeiten des Arbeitsgedächtnisses [88].

Die Darstellung der leistungssteigernden Wirkung von BME zeigt, dass fast die Hälfte der beschriebenen Studien mit einem BME der Firma KeenMind® vollzogen wurden. Daneben ist anzumerken, dass Untersuchungen zur Leistungssteigerung immer ähnlich bzw. gleich ablaufen, wodurch die untersuchte Person möglicherweise durch einen Lerneffekt eine höhere Leistung bei der erneuten Testung erbringen kann. Deswegen ist es von enormer Wichtigkeit, dass die Placebogruppe bei der Auswertung der Signifikanzen miteingerechnet wird. Allgemein kann aber gesagt werden, dass alle Tests eine leichte Verbesserung durch die Einnahme zeigen.

Angstlösende, adaptogene und antidepressive Wirkung

Da es auch zur angstlösenden, adaptogenen und antidepressiven Wirkung des Extraktes sowohl Tierstudien als auch Humanstudien gibt, werden wiederum ausschließlich die humanen placebo-kontrollierten Doppelblindstudien beschrieben, welche den reinen Extrakt von Brahmi ohne weitere Additive untersuchen. Als Adaptogene werden pflanzliche Inhaltsstoffe, die in phytopharmazeutischen Medizinsystemen verschiedener Länder angewendet werden, bezeichnet. Die Einnahme soll Stress lindern und den Gleichgewichtszustand verbessern [89].

Stough et al. haben 2001 in ihrer Studie zur Leistungssteigerung bei der Einnahme von zwei Kapseln BME (KeenMind®, 150 mg, Gehalt von mindestens 55 % Bacosiden) über zwölf Wochen auch die Wirkung auf die Zustands- und die Eigenschaftsangst, auf Stress und auf die Stimmung bei gesunden Probanden (18-60 Jahre) untersucht. Das Ergebnis der Studie zeigt, dass die Ängste nach zwölf Wochen Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,01$) niedriger ist als bei der Placebogruppe. Auf Stress und Stimmung hatte die Einnahme des Extraktes keine signifikante Wirkung [76].

Auch Roodenrys et al. haben in einer Studie von 2002 neben der Leistungssteigerung eine Untersuchung zu Stress, Angst und Depression gemacht. Die gesunden Teilnehmer (40-65 Jahre) haben über drei Monate BME (KeenMind®, 300 mg < 90 kg, 450 mg > 90 kg) eingenommen, es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt [78].

In einer Studie von Calabrese et al. aus dem Jahr 2008 wurden die Effekte eines BME (Medi-Herb Pty. Ltd., 300 mg, Gehalt von mindestens 50 % Bacosid A und B) im Vergleich zu einem Placebo auf gesunde ältere Menschen über 65 Jahren untersucht. Die Teilnehmer haben alle über sechs Wochen ein Placebo eingenommen, bevor sie dann entweder ein Placebo oder den BME über zwölf Wochen eingenommen haben. Dabei wurde die Zustands- und die Eigenschaftsangst untersucht. Des Weiteren wurden depressive Symptome und die aktuelle Stimmung untersucht. Dabei zeigte die Einnahme des Extraktes keine signifikante Wirkung auf die Zustands- und Eigenschaftsangst, auf depressive Symptome und auf die Stimmung [82].

Downey et al. haben in ihrer Studie von 2013 neben der leistungssteigernden Wirkung auch auf die akute adaptogene Wirkung von BME (Keenmind®, 320 mg oder 640 mg, Gehalt von 55 % Bacosiden) zwei Stunden nach Einnahme auf Probanden (18-56 Jahre) untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden [86].

In einer Studie von Sathyanarayanan aus dem Jahr 2013 wurde die Wirkung auf die Zustands- und die Eigenschaftsangst einer täglichen Einzeldosis von BME (Bacomind™, 450 mg) im Vergleich zu einem Placebo über zwölf Wochen bei gesunden Probanden (35-60 Jahre) untersucht. Dabei zeigte der Extrakt keine signifikante Wirkung auf die Ängste der Probanden [85].

Benson et al. haben in einer Studie von 2014 die Wirkung eines BME (Keenmind®, 320 mg oder 640 mg, Gehalt von 55 % Bacosiden) im Vergleich zu einem Placebo bei gesunden Erwachsenen (18-44 Jahre) untersucht. Dabei wurden die Probanden vor einer Untersuchung zur Leistungssteigerung und nach einer Untersuchung zur Leistungssteigerung auf die Stimmung, den Angstzustand und das Cortisol-Level untersucht. Dasselbe Verfahren wurde nach einer und nach zwei Stunden nach der Einnahme des BME oder des Placebos durchgeführt. Dabei ergab sich für die Einnahme von 320 mg BME ein signifikant ($p < 0,05$) positiver Effekt bei der Aufmerksamkeit auf die Testgruppe nach zwei Stunden und vor dem letzten Leistungssteigerungstest. Auf die Gelassenheit und den Angstzustand wirkte sich die Einnahme des Extraktes nicht signifikant ($p < 0,05$) aus. Das Cortisol-Level war nach einer und nach zwei Stunden vor dem Leistungssteigerungstest durch die Einnahme von 640 mg BME signifikant ($p < 0,05$) niedriger [87].

Bei der Untersuchung der angstlösenden, adaptogenen und antidepressiven Wirkung des BME werden viele der Untersuchungen mit einem Extrakt der Firma KeenMind® durchgeführt. Bei vielen Studien zeigte die Einnahme des Extraktes auf die Probanden keine Wirkung.

Antioxidative und neuroprotektive Wirkung

Die antioxidative und neuroprotektive Wirkung des BME wurde häufig in Tierversuchen untersucht. Im Folgenden werden ausschließlich *in vivo* Tierstudien (Ratten und Mäuse) diskutiert,

welche eine Kontrolle und einen Signifikanztest beinhalten und die Wirkung des reinen BME ohne weitere Zusatzstoffe oder Reinsubstanzen aus *B. monnieri* in Regionen des Gehirns untersuchen.

Bhattacharya et al. haben in einer Studie von 2000 die Auswirkungen der täglichen Gabe von BME (Gehalt von 82 % Bacosid A, 5 und 10 mg/kg) nach sieben, 14 und 21 Tagen bei Ratten auf die Superoxiddismutaseaktivität, die Katalaseaktivität und die Glutathionperoxidaseaktivität in Cortex, Striatum und Hippocampus untersucht. Dabei zeigte die Einnahme des BME nach sieben Tagen noch keine Wirkung, nach 14 und 21 Tagen waren die drei untersuchten Aktivitäten in Cortex, Striatum und Hippocampus signifikant ($p < 0,05$ oder kleiner) gesteigert. In allen Untersuchungen war die höhere Konzentration (10 mg/kg) in ihrer Aktivität ($p < 0,01$ oder kleiner) höher als die niedrige Konzentration (5 mg/kg) des BME [61].

Anbarasi et al. haben in Studien von 2005 und 2006 die antioxidative Wirkung von Bacosid A auf Ratten, welche Zigarettenrauch ausgesetzt waren, untersucht. Der Zigarettenrauch sollte oxidativem Stress entsprechen. Den Ratten wurde über zwölf Wochen Bacosid A (10 mg/kg) verabreicht, wobei diese zwei Mal täglich für drei Stunden dem Rauch ausgesetzt waren. Dabei wurde das Level der Creatin-Kinase im Gehirn durch den Rauch gesenkt, wobei die Einnahme des BME einen signifikant ($p < 0,001$) protektiven Effekt zeigt [90]. Das Lipidperoxidlevel im Gehirn wurde durch den Zigarettenrauch erhöht, wobei auch hier die zusätzliche Einnahme von Bacosid A das Level signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt hat. Allein durch die Einnahme der Saponine wurde das Lipidperoxidlevel bei unbehandelten Ratten verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) gesenkt. Außerdem wurden die Level der Na^+/K^+ -ATPase, der Ca^{2+} -ATPase und der Mg^{2+} -ATPase durch den Rauch im Gehirn deutlich gesenkt, wobei signifikant ($p < 0,001$) höhere Werte durch die Einnahme des Bacosid A bestimmt wurden [91]. Das Cholesterolllevel wurde durch den Zigarettenrauch in Mitochondrien des Gehirns gesteigert und mittels Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) gesenkt auf ein Level, was nahezu der unbehandelten Kontrolle entspricht. Das durch den Zigarettenrauch gesenkte Phospholipidlevel in den Mitochondrien des Gehirns konnte durch das Einnehmen von Bacosid A nahezu auf das Kontrolllevel angehoben werden ($p < 0,001$). Außerdem wurden gesenkte Aktivitäten von Enzymen des Citratzyklus durch den Zigarettenrauch gemessen, welche durch die Einnahme von Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) erhöht werden konnten [92]. Die untersuchten Aktivitäten der Superoxiddismutase, der Katalase, der Glutathionperoxidase und der Glutathionreduktase im Gehirn ergab, dass alle Ratten, welche Bacosid A eingenommen haben, signifikant ($p < 0,001$) höhere Aktivitätswerte aufzeigen als die Kontrollgruppe, welche dem Rauch ausgesetzt war. Außerdem waren nur durch die Einnahme von Bacosid A (ohne Zigarettenraucheinwirkung) die Aktivitäten im Gegensatz zur Kontrollgruppe (ohne Zigarettenraucheinwirkung) auch signifikant ($p < 0,01$) erhöht. Weiterhin wurden die Level von reduziertem Glutathion und Vitamin C, E und A untersucht, wobei alle durch die Einnahme der Saponine signifikant ($p < 0,001$) erhöht waren. Die Bacosid A einnehmende Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (ohne Zigarettenraucheinwirkung) zeigt auch ein signifikant ($p < 0,05$) erhöhtes Level

an reduziertem Glutathion. Durch den Zigarettenrauch ist das Caeruloplasminlevel im Gehirn signifikant niedriger ($p < 0,001$) als bei Kontrollratten, wobei durch die Einnahme des Extraktes das Level nahezu den unbehandelten Ratten entspricht. Außerdem sind die Level von Eisen und Kupfer durch den Zigarettenrauch signifikant ($p < 0,001$) erhöht. Diese wurden durch die Einnahme des Extraktes auf das Level der unbehandelten Ratten gesenkt [93]. Kritisch zu sehen ist in allen drei Studien, dass eine wässrige Suspension an Bacosid A verabreicht wurde, obwohl Bacosid A in reinem Wasser nicht gelöst werden kann, wodurch die genaue Konzentration, die bei den Ratten ankommt, ungewiss ist.

In Studien von Jyoti et al. aus dem Jahr 2006 und 2007 wurde die neuroprotektive Kapazität eines ethanolischen BME (Gehalt von 55-60 % Bacosiden) bei aluminium-induziertem oxidativem Stress im Hippocampus und in der Großhirnrinde von Ratten untersucht. Dabei wurden die Ratten über fünf Wochen entweder mit Aluminiumchlorid ($AlCl_3$) oder mit Aluminiumchlorid und BME (40 mg/kg) behandelt. Ergebnis der Studien war, dass die durch Aluminiumchlorid angestiegene Lipid- und Proteinperoxidation im Hippocampus und in der Großhirnrinde durch die Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden kann. Die Aktivität der Superoxiddismutase sinkt durch die Aluminiumgabe in beiden Geweben, wobei diese durch die Einnahme des BME bei den oxidativ gestressten Ratten signifikant ($p < 0,05$) erhöht war. Das Level der Glutathionperoxidase, der Glutathion-S-Transferase und des reduzierten Glutathions in der Großhirnrinde war durch den oxidativen Stress gesenkt, konnte jedoch durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesteigert werden [94, 95].

Kapoor et al. haben in einer Studie von 2008 die antioxidativen Effekte von BME auf diabetische Ratten untersucht. Nach der Gabe eines hydroethanolischen Extraktes unterschiedlicher Konzentrationen (50, 125 und 250 mg/kg) über 15 Tage wurden die Ratten auf ihr Malondialdehydlevel, das Level des reduzierten Glutathions und die Katalase- und die Glutathionaktivität im Klein-, Mittel- und Großhirn untersucht. Das Malondialdehydlevel war in den drei Geweben bei allen diabetischen Ratten, welche den Extrakt bekommen haben, signifikant ($p < 0,05$) gesenkt im Vergleich zur diabetischen Kontrolle. Im Großhirn senkte die Einnahme des BME in höchster Konzentration (250 mg/kg) das Malondialdehydlevel bei gesunden Ratten bei Vergleich mit eben solchen signifikant ($p < 0,05$). Das Level des reduzierten Glutathions war bei diabetischen Ratten deutlich gesenkt, ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg konnte jedoch im Großhirn mit allen getesteten Konzentrationen des BME, im Mittelhirn mit 50 mg/kg und 250 mg/kg BME und im Kleinhirn nur mit der höchsten Konzentration an BME erzielt werden. Die Katalase- und die Glutathionperoxidaseaktivität, welche bei diabetischen Ratten deutlich gesenkt war, konnte bei nahezu allen getesteten Konzentrationen signifikant ($p < 0,05$) gesteigert werden [96].

In zwei Studien von 2008 und 2009 haben Paulose und seine Mitarbeiter die neuroprotektive Rolle der 15-tägigen Einnahme eines wässrigen BME (300 mg/kg) bei epileptischen Ratten im

Hippocampus und im Kleinhirn untersucht. Dabei wurde die Epilepsie durch Pilocarpin ausgelöst. Die Glutamatdehydrogenaseaktivität war bei epileptischen Ratten im Hippocampus deutlich gesteigert, durch die Einnahme des Extraktes wurde diese jedoch signifikant ($p < 0,01$) gesenkt. Das erreichte Level entsprach dem der unbehandelten Kontrolle. Außerdem wurde bei der Untersuchung von der maximal möglichen Sättigung des Glutamatrezeptors im Hippocampus herausgefunden, dass die Sättigung durch Glutamat bei epileptischen Ratten deutlich gesenkt ist, wobei diese durch die Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,01$) erhöht werden konnte. Auch die Vervielfältigung des NMDA R1 Rezeptors im Hippocampus wurde durch die ausgelöste Epilepsie deutlich gesenkt, durch die zusätzliche Einnahme des Extraktes wurde diese jedoch signifikant ($p < 0,05$) gesteigert [97]. Der Serotoningehalt bei epileptischen Ratten im Kleinhirn war deutlich gesenkt, aber durch die anschließende Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesteigert. Die Untersuchung der maximal möglichen Sättigung eines Serotoninrezeptors (5-HT_{2c}) im Kleinhirn ergab, dass diese bei epileptischen Ratten deutlich gesenkt war, durch die Behandlung mit BME jedoch signifikant ($p < 0,001$) gesteigert wurde [98].

Saraf et al. haben in einer Studie von 2010 die neuroprotektive Wirkung eines BME (Gehalt von 55 % Bacosiden) auf Ratten, bei welchen es durch die Verschließung der inneren Halsschlagader zu einer vorübergehenden Ischämie kommt, getestet. Nachdem die Ischämie bei den Ratten ausgelöst war, wurde diesen der BME in verschiedenen Konzentrationen verabreicht (120, 160 und 240 mg/kg). Durch die Ischämie wurde das Nitritlevel und die Lipidperoxidaseaktivität erhöht, welche durch die Einnahme aller Konzentrationen des BME im Gehirn signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden kann. Zusammenhänge zwischen der ausgelösten Ischämie und der Katalase-, Superoxiddismutase- und Glutathionperoxidaseaktivität in Verbindung mit der Einnahme des BME sind nicht zu erkennen [99].

In einer Studie von Uabundit et al. von 2010 wurden die neuroprotektiven Effekte eines ethanolischen BME (Gehalt von 5 % Bacosiden) auf Ratten untersucht. Den Ratten wurde ein cholinerges Neurotoxin (AF64A, Ethyl-2 Hydroxyethylaziridinium) über eine Woche gegeben, um Alzheimer im Tiermodell darzustellen. Den Ratten wurden zwei Wochen vor und eine Woche nach der Gabe des Neurotoxins der BME (20, 40 und 80 mg/kg) verabreicht. Anschließend wurde die Dichte überlebender Neuronen und die Dichte cholinergischer Neuronen in verschiedenen Subregionen des Hippocampus untersucht. Dabei zeigte der Extrakt in 20 mg/kg die stärksten signifikanten ($p < 0,05$) Effekte auf die CA1 und CA3 Region und den Gyrus dentatus. Einen deutlich signifikanten ($p < 0,05$) Effekt auf die CA2 Region zeigte der Extrakt in 40 mg/kg. Bei der Dichte der cholinergen Neuronen wurden die Gabe von 40 mg/kg BME untersucht. Ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Dichte wurde in der CA1 und CA3 Region festgestellt, auf die beiden anderen Regionen zeigte die Einnahme des Extraktes nahezu keine Wirkung [30].

In einer Studie von Shinomol und Muralidhara von 2011 wurde die antioxidative Wirkung eines BME auf Mäuse über vier Wochen untersucht. Dabei wurden 0,5 % und 1,0 % an BME der täglichen Nahrung zugemischt. Anschließend wurden Marker für oxidativen Stress (Level der reaktiven Sauerstoffspezies, Malondialdehydlevel, Carbonylproteine und Hydroperoxidlevel) im Cytosol des Cortex, des Kleinhirns, des Hippocampus und des Striatum untersucht. Dabei wurden alle Level durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt, wobei die höhere Konzentration des BME bessere Ergebnisse erzielt hat. Außerdem wurden die Level von reduziertem Glutathion, Katalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase im Cytosol durch die Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,05$) gesteigert [100].

Mathew et al. haben in Studien von 2011 und 2012 zusammen mit Paulose als Korrespondenzautor Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung von BME und Bacosid A auf Pilocarpin induzierte Epilepsie bei Ratten untersucht. Dabei wurde den Ratten über 15 Tage der wässrige BME (300 mg/kg) oder Bacosid A (150 mg/kg) verabreicht. Anschließend wurden Veränderung der GABA Rezeptoren im zerebralen Kortex und im Hippocampus untersucht. Bei den epileptischen Ratten zeigte sich, dass die Vermehrung des GABA_{Aα1} bei epileptischen Ratten signifikant gesenkt ist und durch die Einnahme von BME und Bacosid A im Hippocampus ($p < 0,001$) und im zerebralen Kortex (BME: $p < 0,01$, Bacosid A: $p < 0,05$) signifikante Steigerungen zeigt. Auch für die Vermehrung des GABA_{Aα5} wurde gezeigt, dass diese im zerebralen Kortex bei epileptischen Ratten stark gesteigert ist und durch die Einnahme des BME und Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) gesenkt werden konnte. Im Hippocampus war die Vermehrung des GABA_{Aα5} bei epileptischen Ratten gesenkt und wurde durch die Einnahme des BME und Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) gesteigert. Für die Vermehrung des GABA_{Aγ5} und des GABA_{Aδ5} wurde festgestellt, dass diese bei epileptischen Ratten gesenkt ist und durch die Einnahme des BME und Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) gesteigert wurde in beiden Geweben [101, 102]. Kritisch zu sehen ist bei beiden Studien, dass der Bacosid A Gehalt im BME nicht bestimmt wurde, wodurch keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob Bacosid A die aktive Substanz des Extrakts ist. Da hier mit Wasser extrahiert wurde, kann dies eher ausgeschlossen werden. Dadurch ist keine Vergleichbarkeit gegeben.

Shobana et al. haben in einer Studie von 2012 die prophylaktische Wirkung eines ethanoli-schen BME (20 und 40 mg/kg) auf Ratten untersucht. Dabei wurden die Ratten über drei Wochen mit BME behandelt, bevor dann eine neuronale Läsion ausgelöst durch 6-Hydroxydopa-min (OHDA) verursacht wurde. Die Behandlung mit OHDA ist ein Parkinsonmodell, da OHDA toxisch für katecholaminerge Signalwege ist. Drei Wochen nach der neuronalen Läsion wurden die Ratten untersucht. Dabei zeigte der BME (40 mg/kg) die stärkste signifikante ($p < 0,05$) Verringerung des durch OHDA gestiegenen Levels der Lipidperoxidation in der Substantia nigra. Auch das durch die neuronale Läsion reduzierte Level an Glutathion in der Substantia nigra wurde durch die Einnahme der hohen Konzentration an BME signifikant gesteigert ($p < 0,01$). Das Level der Superoxiddismutase, der Katalase, der Glutathionperoxidase, der

Glutathionreduktase und der Glutathion-S-Transferase im Striatum wurden durch ODHA gesenkt und durch die hohe Konzentration an BME signifikant gesteigert ($p < 0,01$) [103].

In einer Studie von Sumathi et al. von 2012 wurden die neuroprotektiven Effekte von BME (40 mg/kg) auf das Kleinhirn von Ratten untersucht, welche oxidativem Stress ausgesetzt waren. Dabei wurden die Ratten mit Methylquecksilberchlorid (MM-Cl) oxidativem Stress ausgesetzt. Die Ratten wurden über drei Wochen eine Stunde vor der Behandlung mit MM-Cl mit BME behandelt. Die durch das MM-Cl gesteigerten Level der Lipidperoxidation, der Carbonylproteine und der Glutathionreduktase wurden durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesenkt. Die bei oxidativem Stress gesenkten Level der Superoxiddismutase, der Katalase, dem reduzierten Glutathion und der Glutathionperoxidase wurden durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesteigert. Sowohl das Nitrit- als auch das Nitratlevel waren durch MM-Cl gestiegen, die gleichzeitige Einnahme des BME senkte das Level jedoch signifikant ($p < 0,01$) [104].

In einer Studie von Shinomol et al. von 2012 wurde die neuroprotektive Aktivität eines BME (5 mg/kg) auf Rotenon behandelte Mäusen untersucht. Rotenon, ein Furocumarinderivat, welches als Insektizid verwendet wird, löst oxidativen Stress, mitochondriale Funktionsstörungen und Neurodegeneration aus. Den Mäusen wurde zuerst über sieben Tage BME verabreicht und anschließend wurde nach 30 Minuten Rotenon injiziert. Das durch Rotenon gesteigerte Level an Malondialdehyd, der reaktiven Sauerstoffspezies, der Carbonylproteine und der Hydroperoxide im Cortex, Kleinhirn, Hippocampus und Striatum wurde durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt. Die bloße Einnahme des BME ohne Behandlung mit dem Furocumarinderivat zeigte auf alle untersuchten oxidativen Marker signifikant ($p < 0,05$) gesenkte Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das durch das Rotenon gesenkte Glutathionlevel wurde durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Die Einnahme des Extraktes ohne weitere Behandlung steigerte das Glutathionlevel signifikant ($p < 0,05$) [105].

Shinomol et al. haben in einer Studie von 2012 die prophylaktische, antioxidative Wirkung eines ethanolischen BME auf Mäuse untersucht. Die Mäuse haben über zehn Tage BME (5 mg/kg) eingenommen, bevor an den letzten beiden Tagen auch 3-Nitropropionsäure (NPA) injiziert wurde. Anschließend wurde im Cortex, im Kleinhirn, im Hippocampus und im Striatum das Malondialdehydlevel, das Level der reaktiven Sauerstoffspezies, das Carbonylproteinlevel und das Hydroperoxidlevel untersucht, wobei alle Marker für oxidativen Stress im Gegensatz zur NPA Kontrolle signifikant ($p < 0,05$) gesenkt waren. Zudem wurde die Katalaseaktivität in allen Geweben und die Glutathionperoxidaseaktivität und die Superoxiddismutaseaktivität in Cortex, Kleinhirn und Striatum signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Nur durch die Einnahme des BME war die Katalaseaktivität, die Glutathionperoxidaseaktivität, die Glutathion-S-transferaseaktivität und die Superoxiddismutaseaktivität signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Außerdem war in allen Geweben das reduzierte Glutathionlevel durch NPA gesenkt, wobei es durch die Einnahme

des BME signifikant ($p < 0,05$) gesteigert wurde. Bereits die Einnahme des BME bei gesunden Mäusen zeigte im Vergleich zur gesunden Kontrolle einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg des reduzierten Glutathions [106].

Eine Studie von Rastogi et al. von 2012 beschreibt die neuroprotektiven Effekte eines methanolischen BME (Gehalt von 30-40 % Bacosiden) bei alten (> 24 Monate) Ratten. Dabei wurde den Tieren über drei Monate der BME verabreicht und anschließend wurde der Lipofuscin- und Acetylcholingehalt im Hirngewebe untersucht. Beide Untersuchungen ergaben, dass der Einsatz von 200 mg/kg bei den Tieren die beste Wirkung zeigte, der Lipofuscingehalt sank signifikant ($p < 0,05$), wohingegen der Acetylcholingehalt signifikant ($p < 0,05$) stieg. Weitere Untersuchungen mit derselben BME Konzentration ergaben, dass die Acetylcholinesteraseaktivität bei alten Ratten signifikant ($p < 0,05$) niedriger war als bei gleichaltrigen Ratten, welche BME eingenommen haben. Keine signifikanten ($p < 0,05$) Effekte waren für die Superoxiddismutaseaktivität und das Carbonylproteinlevel durch die BME Einnahme zu vermerken. Die Lipidperoxidation und die Lipidhydroperoxide waren durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt, wohingegen das Glutathionlevel, die Glutathionreduktaseaktivität, die Katalaseaktivität und die Glutathionperoxidaseaktivität signifikant ($p < 0,05$) gesteigert war im Gegensatz zur Kontrolle [107].

In einer Studie von Thomas et al. von 2013 wurde die neuroprotektive Wirkung eines wässrigen BME (100 mg/kg) und Bacosid A (50 mg/kg) bei Ratten untersucht. Dabei wurde die Wirkung auf die Dopaminrezeptordysfunktion in der Großhirnrinde, ausgelöst durch neonatale Hypoglykämie, in Ratten beobachtet. Die ausgelöste Hypoglykämie wurde nach vier Stunden behandelt. Bei der Untersuchung der ausgelösten Dopaminrezeptordysfunktion zeigte der wässrige BME und Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) positive Effekte. Der Gehalt an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde durch die Hypoglykämie gesenkt, durch die Einnahme des BME und Bacosid A aber signifikant ($p < 0,001$) gesteigert. Die Genexpression der Superoxiddismutase war bei der Hypoglykämie deutlich niedriger, wurde jedoch durch beide Behandlungen signifikant ($p < 0,001$) gesteigert. Der apoptotische Zelltod wurde mittels der Caspase-8-Expression untersucht, wobei diese bei den hypoglykämischen Ratten deutlich gesteigert ist und durch die Behandlung mit dem BME oder Bacosid A signifikant ($p < 0,001$) gesenkt ist [108]. Diese Studie zeigt zwar die deutliche Wirkung des BME und Bacosid A, jedoch ist kritisch zu sehen, dass der Gehalt von Bacosid A im Extrakt nicht bestimmt wurde, wodurch kein direkter Zusammenhang bestimmt werden kann. Weiterhin wird eine Extraktion mit Wasser durchgeführt, wodurch die Bacoside gewöhnlich nicht extrahiert werden. Möglicherweise wirken sich auch noch andere im Extrakt enthaltene Naturstoffe positiv auf die Hypoglykämie aus.

Priyanka et al. beschreiben in ihrer Studie von 2013 die Wirkung eines BME (10 und 40 mg/kg) für zehn Tage auf Ratten. Dabei wurde durch die Einnahme die Superoxiddismutaseaktivität im Hypothalamus (10 mg/kg) signifikant ($p < 0,05$) gesenkt. Die Katalaseaktivität ist durch

BME (beide Konzentrationen) im frontalen Cortex und im Striatum signifikant ($p < 0,05$) angestiegen. Auch die Aktivität der Glutathionperoxidase im Striatum wurde durch die Einnahme des BME (beide Konzentrationen) signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Außerdem wurde die Expression der Phospho-Tyrosinhydroxylase (beide Konzentrationen) und des Nervenwachstumsfaktors (40 mg/kg) durch die Einnahme des BME im Hippocampus signifikant ($p < 0,05$) gesteigert [109].

Shinomol et al. beschreiben in einer Studie von 2013 die prophylaktische, neuroprotektive Wirkung eines BME (Gehalt von ≥ 40 % Bacosiden) bei acrylamid-induzierten Mäusen. Acrylamid wurde hier als Neurotoxin eingestetzt, um oxidative Schäden zu erzeugen. Die Mäuse haben über 30 Tage BME (2 % w/w) eingenommen. Danach wurde für fünf Tage Acrylamid (40 mg/kg) injiziert. Anschließend wurden die Lipidperoxidaseaktivität, das Level der reaktiven Sauerstoffspezies und der Carbonylproteine und die reduzierte Glutathionaktivität untersucht. Dabei wurden signifikante Anstiege im Level der Carbonylproteine ($p < 0,001$) und in der Glutathionaktivität ($p < 0,01$) festgestellt, welche durch das Neurotoxin gesenkt waren. Zudem war die Katalaseaktivität durch Acrylamid reduziert, die Einnahme des BME hat diese jedoch signifikant ($p < 0,05$) gesteigert. Allein durch die Einnahme des Extraktes ohne Behandlung konnte hier eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der Katalaseaktivität bestimmt werden. Die Aktivität der Glutathion-S-Transferase ist durch das Induzieren des Neurotoxins angestiegen, wobei der BME hier die Aktivität signifikant ($p < 0,05$) senken konnte [110].

In einer Studie von Verma et al. aus dem Jahr 2014 wurden die neuroprotektiven Eigenschaften eines ethanolischen BME (Gehalt von 58 % Bacosiden, 40, 80 und 120 mg/kg) auf junge und neonatale Mäuse untersucht. Die Mäuse wurden dabei mit dem Neurotoxin Decabromodiphenylether (PBDE) behandelt, bevor sie nach einer Stunde mit BME behandelt wurden. Durch die Behandlung mit PBDE wurde das Carbonylproteinlevel (oxidierte Proteine) und das Malondialdehydlevel im Hippocampus und im frontalen Kortex bei neonatalen Mäusen signifikant ($p < 0,05$) erhöht und konnte durch die Einnahme der höchsten Konzentration des BME wieder signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden. Die Superoxiddismutase- und die Glutathionperoxidaseaktivität war bei den neonatalen Mäusen durch die PBDE gesenkt und konnte durch die Einnahme des BME (120 mg/kg) wieder signifikant ($p < 0,05$) gesteigert werden [111].

Nannepaga et al. haben in einer Studie von 2014 die neuroprotektiven Effekte von BME auf Ratten im Hippocampus untersucht, welche über einen Monat durch die Behandlung mit Aluminium (Aluminiummaltolat) oxidativem Stress ausgesetzt waren. Eine gleichzeitige Behandlung mit einem ethanolischen BME (40 mg/kg) wurde bei den Ratten, welche dem oxidativen Stress ausgesetzt waren, durchgeführt. Durch das Aluminium war die Lipidperoxidation bei Ratten im Hippocampus gesteigert, jedoch wurde diese durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesenkt. Die Superoxiddismutase-, Katalase- und Glutathionperoxidaseaktivität war durch den oxidativen Stress reduziert, wurde jedoch durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesteigert. Die alleinige Einnahme des Extraktes ohne Behandlung mit

Aluminium zeigte auch signifikante ($p < 0,01$) Effekte auf die Superoxiddismutase-, Katalase- und Glutathionperoxidaseaktivität [112].

Banerjee et al. haben in einer Studie von 2014 die neuroprotektive Wirkung eines BME (Gehalt von 40-50 % Bacosiden) bei chronisch unvorhersehbar gestressten Ratten untersucht. Dabei wurde der BME in verschiedenen Konzentrationen (40, 80 und 120 mg/kg) verabreicht und 30 Minuten später wurde der Stress ausgelöst. Dieser Ablauf erfolgte über vier Wochen. Das durch Stress gesenkte Protein- und mRNA-Level des Wachstumsfaktors BDNF wurde die Einnahme des BME (80 und 120 mg/kg) im Hippocampus und im frontalen Kortex signifikant ($p < 0,001$) gesteigert. Außerdem war das Level des Tropomyosin Rezeptor Kinase B durch den Stress in den untersuchten Geweben gesenkt und wurde durch die Einnahme des BME in den beiden hohen Konzentrationen wieder signifikant ($p < 0,001$) gesteigert auf nahezu das Level der unbehandelten Kontrolle [113].

In einer Studie von Mondal und Trigun von 2015 wurde die Wirkung eines BME (Gehalt von 64 % Bacosid A und 27 % Bacosid B) auf das Kleinhirn von Ratten mit hepatischer Enzephalopathie untersucht. Die hepatische Enzephalopathie wurde ausgelöst durch Thioacetamid (TAA). Die Ratten wurden über 14 Tage mit TAA oder TAA und BME (200 mg/kg) behandelt, wobei es auch eine unbehandelte Kontrollgruppe gab. Es wurde der N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA) untersucht, genauer seine zwei Untereinheiten NR2A und NR2B. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von NR2A durch TAA gesenkt wurde, jedoch durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesteigert wurde. Die Expression von NR2B steigt durch TAA, wobei die Einnahme des BME das Level ungefähr auf dem Level der Kontrollgruppe hält und somit verglichen mit den behandelten Ratten einen signifikanten Effekt ($p < 0,001$) zeigte [114].

Eine Studie von Pandey et al. von 2015 hat die antioxidative Wirkung eines BME (Gehalt von 55 ± 5 % Bacosiden) bei diabetischen Mäusen im Hippocampus untersucht. Dabei wurden die Mäuse über einen Zeitraum von zwölf Wochen mit dem Diabetes auslösenden Streptozotocin (STZ) (100 mg/kg) behandelt und die letzten zwei Wochen wurde ihnen BME in verschiedenen Dosen (50, 100, 150, 200, 250, 300 mg/kg) verabreicht. Das Malondialdehydlevel war bei diabetischen Mäusen deutlich höher als bei gesunden Mäusen, wobei dieses durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden konnte. Auch ein Vergleich der unbehandelten Mäuse mit Mäusen, die BME eingenommen haben, zeigte signifikant ($p < 0,05$) gesenkte Malondialdehydlevel bei allen Konzentrationen. Den größten Effekt hatte in beiden Untersuchungen die höchste Konzentration des BME. Außerdem wurde die Expression einer Untereinheit (GluR2) des Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäurerezeptors (AMPA Rezeptors) untersucht. Die Expression des Glutamaterezeptors war bei diabetischen Ratten deutlich gesenkt, wobei durch die Einnahme des BME diese signifikant ($p < 0,05$) gestiegen ist. Auch hier zeigte die Einnahme der höchsten Konzentration des BME die stärksten Effekte, welche nahezu der unbehandelten Kontrolle entsprachen [115].

Kumar und Modal beschreiben in ihrer Studie von 2016 die Wirkung eines BME (Gehalt von 40-50 % Bacosiden) auf Ratten untersucht, die chronisch unvorhersehbarem Stress ausgesetzt wurden. Die Ratten wurden über fünf Wochen eine Stunde vor der Stressbehandlung mit BME (80 mg/kg) behandelt. Die durch Stress gesenkten Protein Expressionslevel des Wachstumsfaktors BDNF und des Doublecortins (DCX) im Hippocampus wurden durch die Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,01$) gesteigert und entsprachen etwa dem Level der unbehandelten Kontrolle. Außerdem wurden durch Stress das Glutathionlevel und die Katalase- und Superoxiddismutaseaktivität gesenkt, welche durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesteigert werden konnten. Das Malondialdehyd- und das Nitritlevel war bei den gestressten Ratten erhöht, wobei es durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesenkt werden konnte [31].

In einer Studie von Singh et al. von 2017 wird die Wirkung eines ethanolischen BME (Gehalt von ≥ 40 % Bacosiden) bei Mäusen mit Parkinson ausgelöst durch MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) untersucht. Dabei wurde der Extrakt über 30 Tage gegeben und 15 Tage nach Beginn der Gabe des BME wurde MPTP injiziert. Anschließend wurde die Region Substantia nigra untersucht. Das Malondialdehydlevel und das Nitritlevel (NO_2^-) war durch BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt im Vergleich zu den MPTP induzierten Mäusen. Die antioxidative Aktivität gemessen an der Superoxiddismutaseaktivität und der Glutathionreduktaseaktivität war in allen Fällen signifikant ($p < 0,05$) gesteigert im Vergleich zu den mit MPTP behandelten Mäusen. Auch die Glutathionperoxidaseaktivität war durch das MPTP gesenkt und wurde durch die Einnahme des BME gesteigert, jedoch konnte keine Signifikanz ($p < 0,05$) bestimmt werden. Außerdem war das Dopamin-, das 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure- (DOPAC) und das Homovanillinsäure (HVA)-Level bei den behandelten Mäusen gesenkt, wobei die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) positive Effekte auf die Level zeigte. Außerdem wurden die Zahl der Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen bestimmt, welche bei den kranken Mäusen gesenkt war und durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesteigert werden konnte. Das Caspase-3-Level war bei den Mäusen mit Parkinson deutlich erhöht und konnte durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden [116].

Pandey und Prasad beschreiben in ihrer Studie von 2017 die neuroprotektiven Effekte eines BME (Gehalt von 58 % Bacosiden) auf diabetische Mäuse. Diabetes wurde durch Streptozotocin (STZ) ausgelöst. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen geteilt und einer Gruppe wurde zu Beginn STZ injiziert. Nach 14 Wochen wurden die Ratten untersucht und anschließend nochmal in zwei Gruppen eingeteilt, eine Kontrollgruppe und eine weitere Behandlungsgruppe, welche neben STZ auch den BME (100 mg/kg) bekommen haben. Anschließend wurde die Acetylcholinesteraseaktivität im präfrontalen Kortex und im Hippocampus untersucht. Diese wurde durch das STZ jeweils erhöht und konnte durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden [117].

In einer Studie von Waly et al. von 2019 wurde die Wirkung eines hydroethanolischen BME (300 und 450 mg/kg) auf die Neurotoxizität von Aluminiumchlorid (AlCl_3) bei Ratten untersucht. Dabei wurde den Ratten über zwei Wochen der Extrakt gefüttert, bevor die Injektion des Neurotoxins AlCl_3 erfolgte, welches Alzheimer auslösen soll. Anschließend wurde der Gehalt an β -Amyloid, Tau-Protein und Acetylcholinesterase im Gehirn untersucht, welcher durch das AlCl_3 deutlich gesteigert war. Die Einnahme des BME konnte die Gehalte signifikant ($p < 0,001$) senken. Außerdem wurde der Gehalt an Serotonin bei Ratten, welche das Neurotoxin erhalten haben, deutlich gesenkt und durch die Einnahme des BME konnte dieser signifikant ($p < 0,001$) gesteigert werden [118].

Saini et al. beschreiben in ihren Studien von 2012 und 2019 die Wirkung eines *Bacopa monnieri* Rohextraktes bei dementen Ratten. Die Demenz wurde ausgelöst durch das Alkaloid Colchicin. Nach der Infusion des Alkaloids wurden die Ratten mit BME (50 mg/kg) für 15 Tage behandelt. Die gesteigerten Level der Lipidperoxidation, der Carbonylproteine und des Glutathions durch Colchicine wurden durch die Einnahme des BME in der Großhirnrinde und im Hippocampus signifikant ($p < 0,05$) gesenkt. Die durch das Alkaloid gesenkten Aktivitäten der Superoxiddismutase und der Katalase wurden durch die Einnahme des BME gesteigert, signifikant ($p < 0,05$) verbesserte Werte konnten außer in der Großhirnrinde überall bestimmt werden. Auch die gesenkten Aktivitäten der Glutathionperoxidase, der Glutathionreduktase, der Glutathion-S-transferase und der Na^+/K^+ -ATPase konnten in nahezu allen Geweben durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesteigert werden. Die Glutathionperoxidase im Hippocampus konnte durch den BME nicht gesteigert werden. Durch die Infusion des Alkaloids wurde die Aktivität der Acetylcholinesterase in beiden untersuchten Geweben gesteigert, wobei durch die Einnahme des BME eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion erreicht werden konnte, welche nahezu der unbehandelten Kontrolle entspricht [119]. Das Nitritlevel und das Level der reaktiven Sauerstoffspezies war sowohl im Cortex als auch im Hippocampus durch die Gabe des BME signifikant ($p < 0,05$) niedriger als bei Colchicin-induzierten Ratten. Auch die Protein- und mRNA-Level von Zytokinen (IL-6, $\text{TNF}\alpha$ und MCP-1) wurde durch die Gabe des Alkaloids gesteigert, wobei die Level durch die anschließende Behandlung mit BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden konnten [120]. Auch die gestiegenen Protein- und mRNA-Level der Cyclooxygenase-2, der Beta-Sekretase1 und der Stickstoffmonoxid-Synthase bei den dementen Ratten war durch die Einnahme des BME im Hippocampus und in der Großhirnrinde signifikant ($p < 0,05$) gesenkt [119, 120].

In einer Studie von Singh et al. von 2020 wurden die neuroprotektiven Effekte der vierwöchigen Gabe eines BME (Gehalt von 40 % Bacosiden, 40 mg/kg) auf Ratten mit anschließend, gleichzeitig oder vorherig ausgelöstem Parkinson untersucht. Um die Krankheit auszulösen, wurde den Tieren über vier Wochen Rotenon verabreicht. Durch die Gabe des Rotenons war das $\text{TNF}\alpha$ -, MIP-1 β - und das IL-6-Level in Hippocampus, Substantia nigra, Striatum, Cortex und Hirnstamm signifikant ($p < 0,05$) erhöht, wobei es sowohl bei anschließend, gleichzeitig oder vorherig ausgelöstem Parkinson durch den Extrakt signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden

konnte. Auch das Level von IL-1 β war durch Rotenon deutlich erhöht und konnte in Hippocampus, Substantia nigra, Striatum und Hirnstamm durch alle Einnahmevarianten signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden. Im Cortex wurde es nur durch die vorherige oder gleichzeitige Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt [121].

Micheli et al. beschreiben in ihrer Studie von 2020 die neuroprotektiven Effekte eines BME (Gehalt von 20 % Bacosiden) bei Mäusen. Die Mäuse bekamen eine Woche lang BME (200 mg/kg), bevor eine psychische Störung durch Lipopolysaccharide ausgelöst wurde. Diese psychische Störung beinhaltet, dass weniger Freude und Lust empfunden werden. Die gesteigerten Level an IL-6, IL-1 β und Cortisol im präfrontalen Kortex wurden durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,05$) gesenkt. Das BDNF- und ARTN-Level stieg durch die Einnahme des BME signifikant. Das Level der Lipidperoxidation ist durch die Anhedonie gestiegen, durch die Einnahme des BME wurde es jedoch signifikant ($p < 0,01$) gesenkt. Die Katalaseaktivität war bei den freudlosen Mäusen niedriger, konnte jedoch durch die Einnahme des BME signifikant ($p < 0,01$) gesteigert werden [122].

Durch die Darstellung der literaturbekannten Untersuchungen zur Pflanze *B. monnieri* wird deutlich, dass viele Untersuchungen der antioxidativen Kapazitäten auf den Ergebnissen von Bhattacharya et al. und Anbarasi et al. basieren [61, 90-93]. Oftmals wurde eine durch eine Chemikalie ausgelöste Krankheit mit BME behandelt. Hierbei ist kritisch zu sehen, dass viele Studien zwar den Gehalt an Bacosiden beschreiben, der Extrakt jedoch nicht auf weitere Inhaltsstoffe untersucht wurde, welche möglicherweise in dem durchgeführten Test auch von Wichtigkeit sein könnten. Selten wird Bacosid A als Reinsubstanz gegengetestet, wodurch die Effektivität der Saponine bestätigt werden könnte. Teilweise findet auch eine Extraktion des Pflanzenmaterials mit Wasser statt, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass eine große Menge an Bacosiden extrahiert wurde und die Aktivität somit anderen Inhaltsstoffen zugeschrieben werden muss. Bedauerlicherweise sind die beschriebenen Studien auch von Fehlern geprägt. So beschreiben beispielsweise Shinomol und Muralidhara unter anderem Luteolin und Apigenin als Hauptsaponine in BME, obwohl es sich hierbei um Flavonoide handelt [100]. Die Studie von Micheli et al. untersucht den Bacosidgehalt mittels einer Referenzsubstanz Bacosid II, welche nicht käuflich erwerbbar ist (hierbei handelt es sich womöglich um Bacopasid II) [122]. Insgesamt zeigt jedoch die Studiendichte zu den neuroprotektiven Eigenschaften des BME, dass eine Wirkung vorliegt, der genaue Mechanismus der Neuroprotektion ist jedoch weitgehend ungeklärt.

2.2 Indolalkaloide

Als Alkaloide werden stickstoffhaltige Strukturen bezeichnet, wobei dieser Stickstoff meist heterozyklisch gebunden ist [66]. Die Indolalkaloide, eine Untergruppe der Alkaloide, leiten sich in ihrer Struktur von der Aminosäure Tryptophan ab [66].

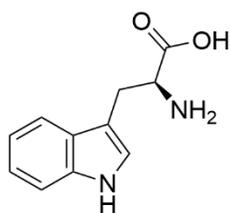


Abbildung 9: Grundgerüst der aromatischen Aminosäure Tryptophan.

Die pharmakologischen Eigenschaften vieler Indolalkaloide können durch die Strukturähnlichkeit zu verschiedenen körpereigenen Botenstoffen und Tryptophanderivaten wie Serotonin und Melatonin erklärt werden [66].

2.2.1 Indirubine und Thioindirubine

Als Indirubine werden natürlich vorkommende Bisindolalkaloide bezeichnet, welche sowohl in Weichtieren als auch in Pflanzen vorkommen [123]. Zu diesen Pflanzen zählen unter anderem *Isatis tinctoria*, *Polygonum tinctorium* und *Indigofera tinctoria* [124]. Die Bisindolalkaloide werden aus einer Dimerisierung von Indoxyl und Isatin erhalten [33]. Die Vorstufen dieser Indoxyle und Isatine sind Indican, Isatan und Indoxylsulfat, wobei in der Biosynthese von Indican und Isatan die Aminosäure L-Tryptophan eine Rolle spielt [33, 125]. Neben ihrer Bedeutung als Textilfarbe haben Indirubine eine große Bedeutung in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) zur Behandlung von Leukämie [123]. Hierfür wurde eine Mischung aus elf verschiedenen Phytopharmaka verwendet, welche auch Danggui Longhui Wan genannt wird [32]. Als aktiver Inhaltsstoff wird hier Qing Dai (Indigo naturalis) beschrieben, welches aus den Pflanzen *Baphicacanthus cusia*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica*, *Indigofera suffruticosa* and *Indigofera tinctoria* besteht [32]. Indigo naturalis ist auch dafür bekannt, dass es antibakteriell, entzündungshemmend und beruhigend wirkt [126]. Als Möglichkeiten, Indirubin zu gewinnen, können sowohl die Synthese als auch die Extraktion genannt werden [32, 123]. Um die Löslichkeit dieser nahezu wasserunlöslichen Indirubine zu erhöhen, werden teilweise heterozyklische Indirubine, unter anderem Thioindirubine, synthetisiert (Abbildung 10) [123, 127].

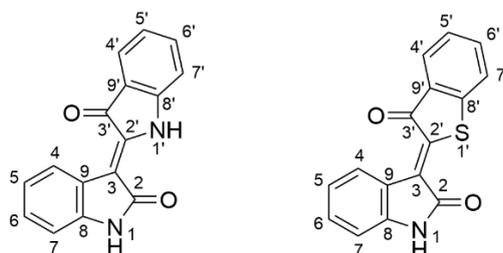


Abbildung 10: Darstellung der Grundgerüste von Indirubin (A) und Thioindirubin (B) mit unterschiedlichem Heteroatom an Position 1'. Indirubin enthält Stickstoff als Heteroatom und Thioindirubin enthält Schwefel als Heteroatom.

Durch die Modifizierung von Indirubin und Thioindirubin mit hydrophilen Seitengruppen können besser wasserlösliche Strukturen geschaffen werden.

Die Thioindirubine wurden von Jennifer Killinger (Forschungspraktikum) und Alexander Widmann (Bachelorarbeit) unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Riepl und Sebastian Bieringer synthetisch hergestellt. Die allgemeine Syntheseroute ist in Abbildung 11 dargestellt.

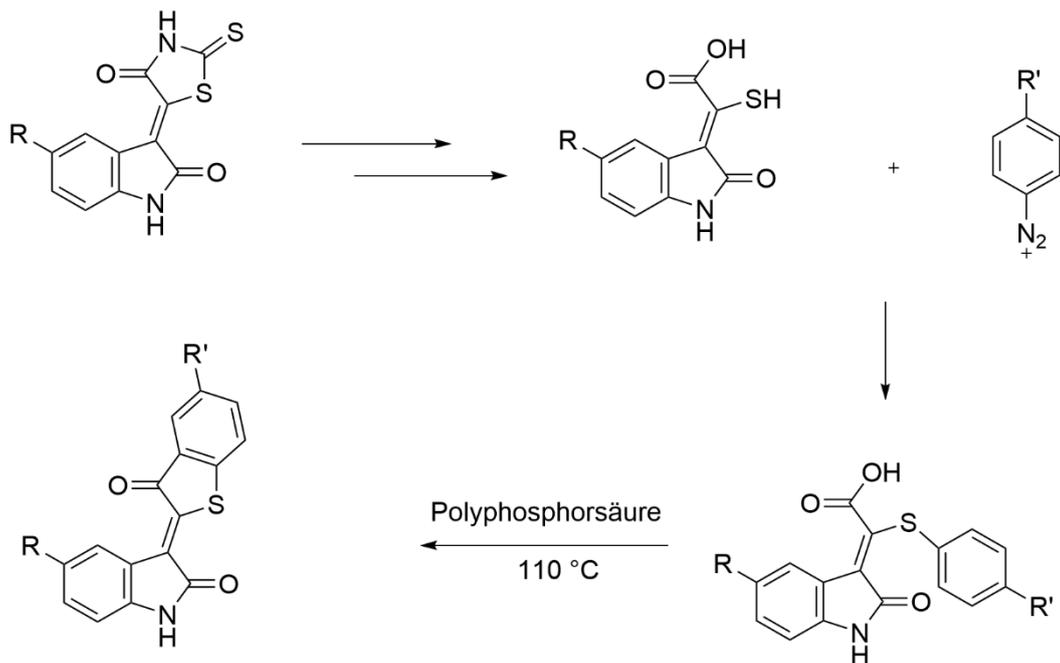


Abbildung 11: Allgemeiner Syntheseweg zur Herstellung von Thioindirubinen nach Riepl und Urmann [127].

Nachdem die Thioindirubinderivate an zwei Stellen verschieden substituiert sein können, sind in Tabelle 1 die hergestellten Derivate mit den Substituenten an R und R' dargestellt.

Tabelle 1: Darstellung der hergestellten Thioindirubinderivate.

Name	R	R'
5'-Thioindirubinessigsäure	H	COOH
5'-Chloro-5-Methylthioindirubin	CH ₃	Cl
5'-Methylthioindirubin	H	CH ₃
5'-Methyl-5-Fluorothioindirubin	F	CH ₃
5'-Methyl-5-Chlorothioindirubin	Cl	CH ₃
5'-Methyl-5-Bromothioindirubin	Br	CH ₃
5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin	CH ₃ O	CH ₃

2.2.2 Pharmakologische Eigenschaften von Indirubinen und Thioindirubinen

Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts gab es die ersten Untersuchungen zu den pharmakologischen Eigenschaften von Indirubinen. De Landsheere hat in einer Kurzmitteilung von 1951 die Wirkung von Indirubin (1 mg gelöst in 0,5 mL Olivenöl) auf Meerschweinchen untersucht, wobei sich nach der Gabe des Indirubins das Verhältnis von Eosinophilen zu Granulozyten im Blut geändert hat. Die Zahl der Eosinophile sank direkt nach der Gabe bis acht Stunden nach der Gabe, während die Zahl der Granulozyten in dieser Zeit stark stieg. Im Vergleich dazu blieben alle Werte nach Injektion von reinem Olivenöl über die komplette Zeitdauer des Experiments stabil [128].

Neben der bereits beschriebenen Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin als Mittel gegen Leukämie haben Hoessel et al. 1999 festgestellt, dass einige Indirubine und Derivate davon Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen sind. CDKs sind bei der Initiierung und der Kontrolle der Phase des Zellzyklus von enormer Bedeutung [32]. Leclerc et al. haben außerdem in einer Studie von 2001 herausgefunden, dass Indirubine starke Inhibitoren der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) sind. GSK-3 β und CDK5 sind für einige abnorme Hyperphosphorylierungen des Proteins Tau zuständig, welches bei der Erforschung von Alzheimer im Fokus steht [33]. Die nachfolgende Tabelle soll als Übersicht über die aktivsten Indirubine und deren Bausteine gelten.

Tabelle 2: Darstellung der IC₅₀ Werte (μ M) für die Inhibition verschiedener Kinasen (GSK-3 (α/β), CDK1 und CDK5) von Indirubin und Indirubinderivaten (in grün: kleinster IC₅₀) [32, 33, 129, 130].

Substanz	GSK-3 (α/β)	CDK1	CDK5
Indirubin	0,60 – 1,00	10,00	5,50 (p35) 10,00 (p25)
Indirubin-5-sulfonsäure	0,28	0,050-0,055	0,065 (p35) 0,065 (p25)
Indirubin-3'-monoxim	0,022	0,18	0,10 (p35) 0,10 (p25)
Indirubin-3'-acetoxim	0,200	1,20	0,70 (p25)
6,5-Dichloroindirubin	0,030	45000	60000 (p25)
Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure	0,080	0,005	0,007
6,5-Dichloroindirubin-3'-monoxim	0,004	0,140	0,060 (p25)
6,5-Dichloroindirubin-3'-acetoxim	0,004	30000	0,100 (p25)

Alle bisher beschriebenen Arbeiten handeln von Indirubinen, während über Thioindirubine wenig veröffentlicht ist. Eine Publikation von Kunz et al. aus dem Jahr 2010 beschreibt die Synthese von Thio-Analoga von Indirubin-N-Glycosiden und deren Einfluss auf humane Melanomzellen. Hierbei wurde die stärkste Inhibierung des Wachstums in drei der vier untersuchten Zelllinien durch das Thioindirubin-N- β -D-Mannose-Glycosid ($IC_{50} < 10 \mu M$) erzielt. Auch das Thioindirubin-N- β -L-Rhamnose-Glycosid zeigte sowohl inhibitorische Wirkung auf die Melanomzellen. Für diese Substanz wurde auch festgestellt, dass diese auch die frühe Apoptose in Melanomzellen auslöst [133].

Bereits getätigte Untersuchungen am Lehrstuhl zu Extrakten von *Isatis tinctoria* auf THP-1 Zellen zeigten eine differenzierende Wirkung dieser zu Makrophagen. THP-1 Zellen sind Monozyten, welche als Zellmodell in der Leukämie angewendet werden. Die Extrakte enthalten unter anderem Indirubin.

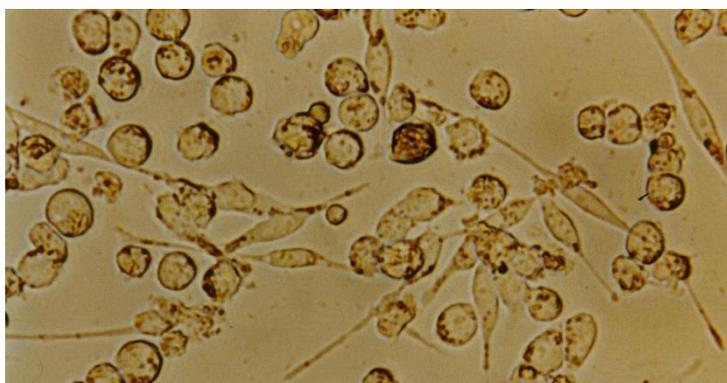


Abbildung 13: Zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen nach Behandlung mit *Isatis tinctoria*. Aufnahme von Herbert Riepl.

2.2.3 3,4-annelierte, peptidartige Indolderivate

Indolderivate kommen sowohl in Pflanzen, als auch in Pilzen und Bakterien vor [134]. Bei den Bakterien sind diese am weitesten bei den Cyanobakterien und den Actinobakterien (*Streptomyces*) vertreten [135]. Neben dem Pyrrolring und dem Benzolring enthalten die im weiteren untersuchten Indolderivate alle noch einen neungliedrigen Lactamring (Abbildung 14) [134]. Für die Biosynthese dieser Indolderivate sind die Aminosäuren L-Valin, L-Methionin und L-Tryptophan entscheidende Bausteine [136].

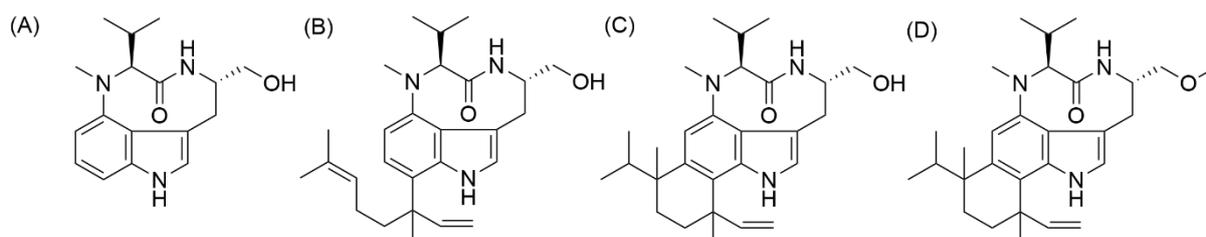


Abbildung 14: Darstellung der im Folgenden untersuchten Indolderivate: Indolactam (A), Lyngbyatoxin (B), Teleocidin (C), Olivoretin (D).

Abbildung 14 zeigt die untersuchten Strukturen, deren Grundstruktur dem Indolactam gleich oder sehr ähnlich ist. Dabei unterscheiden sich Teleocidin und Lyngbyatoxin in den gebundenen Resten an Position 7 des Benzolrings des Grundgerüsts, wobei bei Teleocidin keine Doppelbindung mehr vorliegt und somit ein Sechsring an das Benzol substituiert ist. Teleocidin und Olivoretin sind strukturell sehr ähnlich, der einzige Unterschied liegt in der Hydroxygruppe bei Teleocidin und der Methoxygruppe bei Olivoretin in Nachbarschaft zum neungliedrigen Lactamring.

Das Indolderivat Indolactam wurde synthetisch von Sebastian Bieringer mit kleinen Abweichungen nach einem Protokoll von Haynes-Smith et al. hergestellt [137]. Lynbyatoxin und Olivoretin wurden aus dem Bakterienstamm *Streptomyces blastmyceticum* und Teleocidin B aus dem Bakterienstamm *Streptomyces olivoreticuli* von Sebastian Bieringer extrahiert [138].

2.2.4 Pharmakologische Eigenschaften von Indolderivaten

Eine Untersuchung von Fujiki et al. 1981 ergab, dass Indolactamderivate (Lynbyatoxin und Dihydroteleocidin B) Tumorpromotoren auf der Haut von Mäusen sind. Dabei wurden Mäuse zuerst mit dem Tumorpromotor 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) einmalig behandelt. Anschließend wurden die Mäuse zweimal wöchentlich mit einem der Indolactamderivate behandelt (25 µg/mL). Als Positivkontrolle für die tumorauslösende Wirkung wurde 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) verwendet. Dabei zeigte sich, dass alle mit DMBA und TPA behandelten Tiere nach 16 Wochen Tumoren ausbildeten. Etwa 90 % der mit Dihydroteleocidin B und DMBA behandelten Tiere bildeten nach 19 Wochen Tumoren aus [139].

In einer weiteren Studie von Fujiki et al. aus dem Jahr 1984 wurde die Aktivierung von Proteinkinase C durch die Teleocidin untersucht. Eine Mischung aus Teleocidin A (93 %) und Teleocidin B (7 %) zeigte eine Aktivierung der Proteinkinase C. Dabei wurde diese nur in Anwesenheit von Ca²⁺ und Phospholipid aktiviert, nicht jedoch durch die alleinige Zugabe von Teleocidin. Die untersuchten Effekte sind jedoch nicht so stark wie diese der Positivkontrolle TPA [140].

Eine Studie von Irie et al. untersuchte 1985 Indolactamderivate (Indolactam, Teleocidin B-4 und Olivoretin A) auf die Aktivität des frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus. Dabei wurden menschliche Zellen, welche das Epstein-Barr-Virus Genom tragen, mit den Derivaten behandelt. Anschließend wurden diese auf die Aktivität des frühen Antigens untersucht. Die Wirkung von Indolactam war etwas schwächer als diese von Teleocidin B-4 auf die Epstein-Barr-induzierende Aktivität. Teleocidin B-4 war am aktivsten, wobei auch Indolactam eine sehr hohe Aktivität zeigt [141].

Choi et al. haben 1991 ein Patent über die neuroprotektiven Eigenschaften von Indolactam und dessen Derivate geschrieben. Dabei wird behauptet, dass Läsionen im zentralen Nervensystem ausgelöst durch Hypoxie möglicherweise mit Glutamat-Antagonisten behandelt werden können. Glutamat ist ein Agonist für exzitatorische Aminosäurerezeptoren (NMDA, AMPA und Kainat). Auf der Suche nach Strukturen, die diese Rezeptoren blockieren, sind Choi et al. auf Indolactam gestoßen, wobei auch Teleocidin und Lyngbyatoxin als neuroprotektive Strukturen patentiert wurden [37].

Chen et al. haben in einer Studie von 2009 eine Untersuchung zur Differenzierung menschlicher embryonaler Stammzellen durchgeführt. Ergebnis dieser *in vitro* Studie war, dass Indolactam die Fähigkeit menschlicher embryonaler Stammzellen verbesserte, in verschiedene Pankreaslinien zu differenzieren, was teilweise auch durch Proteinkinase C Signalisierung passiert. Die anschließende *in vivo* Untersuchung der Differenzierung in Mäusen zeigte, dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass die Pankreasdifferenzierung ausgelöst wurde [38].

3 Problemstellung und Zielsetzung

Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit war es, bei einem Screening bioaktiver Naturstoffe einen Überblick zu gewinnen, welche Substanzklassen ein Potential beim Einsatz in der neuroregenerativen Medizin besitzen. Diese aus Pflanzen, Bakterien oder Synthesen gewonnenen Moleküle könnten später ein Therapieansatz bei neurodegenerativen Krankheiten sein.

Der Extrakt der Pflanze *B. monnieri* findet in der Phytotherapie, im Ayurveda und in Nahrungsergänzungsmitteln bereits häufig Anwendung. Hierbei wird oftmals ein konzentrierter Extrakt mit hohem Bacosidgehalt teilweise in Kombination mit anderen Extrakten wie beispielsweise Ginkgo, Ginseng oder Eisenkraut verwendet. Im ersten Teil der Arbeit war das Ziel, Extrakte der Pflanze *B. monnieri* angereichert mit Bacosiden mittels Festphasenextraktion herzustellen. Weiterhin war es wichtig, die gewonnenen Extrakte genauer auf die Inhaltsstoffe zu untersuchen. Dabei wurde der Fokus auf verschiedene Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmittel aus oder mit *B. monnieri* gelegt, da in der Literatur teilweise Unklarheiten über Strukturen herrschen. Hierbei wurden Methoden wie GC-MS, HPLC-ELSD, HPLC-MS und 1D und 2D NMR angewendet, um Strukturen eindeutig aufklären zu können.

Im anschließenden Screening aller erhaltenen Extrakte und Reinsubstanzen galt es herauszufinden, ob der Extrakt der Pflanze *B. monnieri* oder darin enthaltene Reinsubstanzen eine differenzierungsinduzierende Aktivität zeigen. Hierfür wurde ein dualer Luciferase-Assay an embryonalen Vorderhirnzellen der Maus verwendet.

Durch den vorhandenen ethnopharmakologischen Hintergrund und die unzähligen pharmakologischen Untersuchungen wurde das Potential der Pflanze *B. monnieri* und darin enthaltener Reinsubstanzen hoch eingeschätzt. Anhand der vorherigen Anreicherung der Substanzklassen sollte ermittelt werden, ob diese Substanzen eine Wirkung zeigen.

Weiterhin wurden Indolalkaloide auf ihre differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht, denn es ist bereits bekannt, dass Indirubine gegen chronisch myeloische Leukämie aufgrund der Auslösung eines Proliferationsstopp angewendet werden [32]. Ein solcher Proliferationsstopp ist auch bei der Heranreifung von Neuronen erforderlich. Durch einen Proliferationsstopp der Zellen findet im Folgenden möglicherweise eine Differenzierungsinduktion statt. Anhand weiterer Untersuchungen zur CDK und GSK-Inhibition von Indirubinen wurde eine differenzierungsinduzierende Aktivität vermutet [32, 129], da bereits GSK-3 Inhibitoren die Auslösung der Neurogenese bei menschlichen Vorläuferzellen gezeigt haben [142]. Dadurch, dass der Extrakt *Isatis tinctoria* bereits ein differenzierungsinduzierendes Potential bei THP-1 Zellen gezeigt hat, ist die Untersuchung in Bezug auf die Neurogenese naheliegend. Bei der Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Indolalkaloide war es zudem das Ziel, eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung der 3,4-annelierten, peptidartigen Indolderivate und der Thioindirubine aufzustellen, da sich diese beiden Substanzklassen möglicherweise einen Pharmakophor teilen.

4 Extraktherstellung und Strukturaufklärung

4.1 Extraktion von *Bacopa monnieri*

Die Literatur zur Extraktion von *B. monnieri* variiert sowohl in der Extraktionsmethode als auch im Extraktionsmittel. Um die verschiedenen angewendeten Extraktionsmethoden und -mittel für *B. monnieri* darzustellen, wurde in der nachfolgend beschriebenen Tabelle die bestehende Literatur weitestgehend zusammengefasst. Dabei wurden nur Literaturstellen ausgewählt, die genaue Angaben zur verwendeten Methode gemacht haben und im Weiteren den Extrakt auf seine biologische Aktivität untersucht haben. Problematisch anzusehen sind Studien, die weder die genaue Extraktionsmethode [61, 94, 95, 103, 104, 107, 112], noch den Gehalt der Bacoside im Weiteren angeben [96, 103, 104, 112, 118].

Tabelle 3: Darstellung der zur Extraktion von *B. monnieri* verwendeten Extraktionsmethoden, Extraktionsmittel und des Extraktionsmittelverhältnisses unter Angabe der Literaturstellen.

Extraktionsmethode	Extraktionsmittel	Extraktionsmittelverhältnis (v/v)	Literaturstelle
Soxhlet	MeOH	(100)	[143]
Soxhlet	EtOH/H ₂ O	(70/30)	[118]
Soxhlet	EtOH/H ₂ O	(40/60)	[144]
Mazeration	MeOH	(100)	[145-147]
Mazeration	EtOH	(100)	[148]
Mazeration	EtOH/H ₂ O	(50/50)	[96]

Die in Tabelle 3 dargestellte Vielfalt an verschiedenen Extraktionsmethoden und -mitteln macht die Wahl des geeigneten Extraktionsmittels schwieriger, weswegen dies im Zuge der folgenden Vorversuche genauer untersucht wurde, um das Optimum zu bestimmen. Dabei wurde ausschließlich die Mazeration im Hinblick auf den Bacosidgehalt genauer untersucht, da diese zum einen die bevorzugte Methode zur Extraktion von Saponinen darstellt und zum anderen bei Extraktionen bei höheren Temperaturen die Gefahr besteht, dass natürliche Inhaltsstoffe thermisch zersetzt werden [149, 150]. Da die Mazeration sehr zeitintensiv ist, wird zur Unterstützung häufig ein Magnetrührer verwendet, um die Extraktionsdauer zu minimieren [150]. Wie in der Extraktherstellung beschrieben (7.2.3 und 7.2.4) wurde diese Methode angewendet. Ziel dieser Versuche war es, das beste Extraktionsmittel anhand des Bacosid A Gehaltes im Extrakt zu bestimmen, da sowohl Methanol als auch Ethanol in der Literatur weitreichend als geeignete Extraktionsmittel zur Gewinnung von Saponinen beschrieben sind und auch Tabelle 3 zeigt, dass diese beiden Extraktionsmittel die meiste Anwendung finden [151]. Wenige Literaturstellen beschreiben eine Extraktion ausschließlich mit Wasser, jedoch ist diese Extraktionsmethode für die Bacoside aufgrund ihrer amphiphilen Struktur ungeeignet [43].

4.2 Eigene Ergebnisse der Extraktion

Um die optimalen Bedingungen für die Extraktion der Bacoside zu bestimmen, wurden zuerst Vorversuche gemacht, bei denen der Gehalt von Bacosid A bestimmt wurde. Da die im Extrakt enthaltenen Bacoside wie bereits beschrieben häufig als aktive Substanzen in Bezug auf ihre vielseitigen pharmakologischen Eigenschaften genannt werden.

Vorversuche und Extraktionsoptimierung

Die Trockenmasse des Pflanzenmaterials (Terra Elements) der Pflanze *B. monnieri* betrug für drei unabhängige Messungen $88,43 \pm 0,62$ %. Die in den folgenden Ergebnissen dargestellten Konzentrationen an mg Bacosid A pro g Pflanzenmaterial ist auf die Trockenmasse des Pflanzenmaterials bezogen.

Zur Herstellung eines Extraktes mit maximalem Bacosidgehalt unter umsetzbaren Extraktionsbedingungen wurden rührende Mazerationen mit verschiedenen Lösungsmitteln im kleinen Maßstab durchgeführt und untersucht (7.2.3).

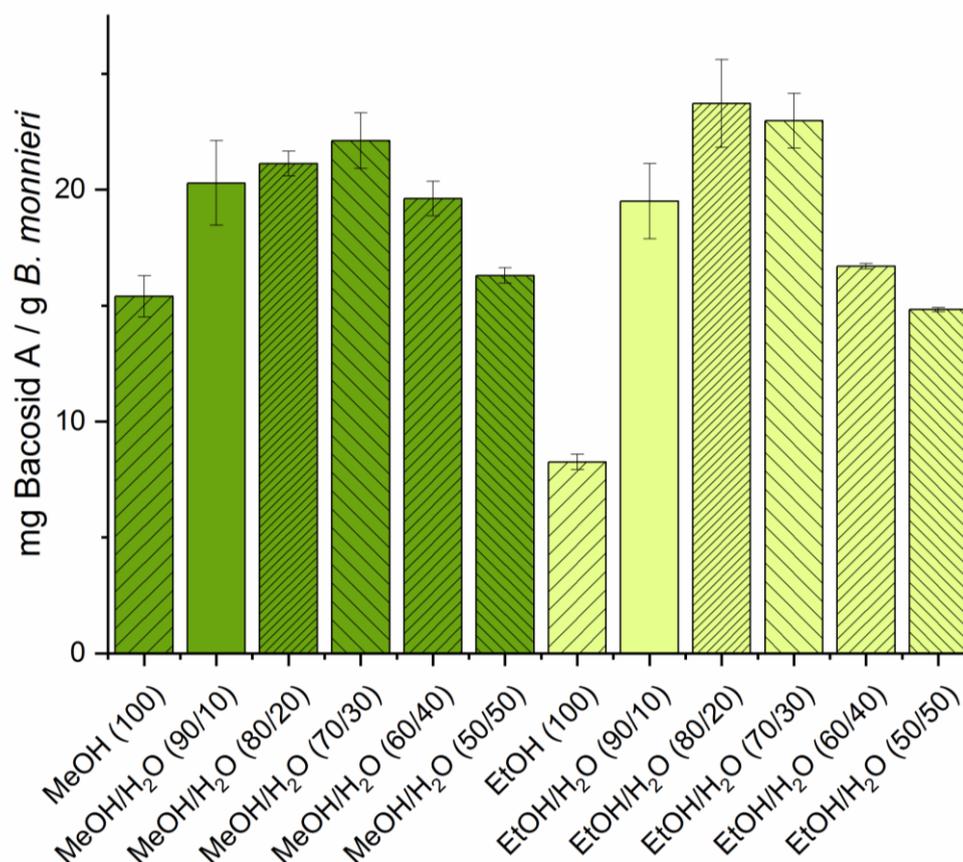


Abbildung 15: Gehalt an Bacosid A in *B. monnieri* (mg Bacosid A pro g *B. monnieri*) bei unterschiedlichen Extraktionsmitteln unter Angabe des Extraktionsmittelverhältnisses (v/v) bei einer rührenden Mazeration.

Abbildung 15 zeigt, dass die Extraktion mit den reinen Extraktionsmitteln Methanol und Ethanol zu relativ geringen Ausbeuten an Bacosid A führten, wobei die Extraktion mit Ethanol zu noch niedrigeren Ausbeuten führte als die Verwendung von reinem Methanol. Dies kann damit begründet werden, dass Methanol deutlich polarer ist als Ethanol und die Saponine einen polaren Anteil an Extraktionsmittel benötigen, da diese aus polaren Zuckerresten geknüpft an unpolare Aglyka bestehen [150]. Mischungen der Lösungsmittel Methanol bzw. Ethanol mit Wasser bewirken eine deutlich höhere Ausbeute an Bacosid A. Trotz der besseren Ausbeute mit Ethanol/Wasser (80/20) (v/v) wurde für die nachfolgenden Versuche eine Mischung aus Methanol/Wasser (90/10) (v/v) verwendet, da ein höherer Wasseranteil die Handhabung erschwert. Die Mischungen der reinen Lösungsmittel mit Wasser führen unter vermindertem Druck zu sehr starker Schaumbildung, da dies eine der Haupteigenschaften der Saponine aufgrund ihrer bereits beschriebenen amphiphilen Struktur ist (2.1.1→Triterpensaponine). Es empfiehlt sich somit bei größeren Ansatzmengen nicht, den Wasseranteil höher als zehn Volumenprozent zu wählen. Der Unterschied zwischen Ethanol/Wasser und Methanol/Wasser (90/10) (v/v) in Bezug auf den Bacosid A Gehalt ist nur gering, weshalb im Weiteren Methanol/Wasser (90/10) (v/v) verwendet wurde. Bei einer weiteren Verwendung des Extraktes in Bezug auf Nahrungsergänzungsmittel oder pharmakologische Untersuchungen empfiehlt es sich jedoch in Zukunft, Ethanol dem Methanol als Extraktionsmittel vorzuziehen, da dieses aufgrund seiner geringeren Toxizität bessere Anwendung bei der Pflanzenextraktion findet [152].

Mit dem festgelegten Extraktionsmittelgemisch wurde im Weiteren noch die Zeitdauer, die Temperatur und das Lösungsmittelverhältnis untersucht. Da sich hier jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern ergaben, wurde für die Extraktion im großen Maßstab eine Zeitdauer von 24 h bei Raumtemperatur und einem Lösungsmittelverhältnis von 1 g Pflanzenmaterial zu 10 mL Extraktionsmittel festgelegt und verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde, wie auch in den Vorversuchen, vor der Extraktion mit Hexan entfettet.

Extraktherstellung und Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei der Herstellung des Extraktes wurde in drei unabhängigen Ansätzen 200,00 g Pflanzenmaterial *B. monnieri* (Terra Elements) mit Hexan unter rührender Mazeration entfettet und anschließend mit Methanol/Wasser (90/10) (v/v) ebenfalls unter rührender Mazeration extrahiert. Bei diesen drei Extraktionen wurde ein Hexanextrakt mit einem Mittelwert von $1,20 \text{ g} \pm 0,04 \text{ g}$ durch die Entfettung erhalten und ein Mittelwert von $31,23 \pm 1,27 \text{ g}$ an hydro-methanolischem Extrakt erhalten. Die Entfettung mit Hexan hat zur Folge, dass unter anderem Fettsäuren abgetrennt wurden, welche in den weiteren Versuchen in Bezug auf die Neurogenese keine Wichtigkeit haben. Mittels GC-MS konnten verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren von C₁₆-C₂₂ detektiert werden. Neben der Tatsache, dass sowohl Rastogi et al. als auch Shahid et al. das vorherige Entfetten mit Hexan bei der Herstellung ihrer Extrakte ausführten, ist dies eine übliche Methode bei der Herstellung von pflanzlichen Extrakten, welche Saponine

enthalten [107, 143, 151]. Die vorherige Extraktion mit Hexan führt dazu, dass später die ungewünschten Fettsäuren und Chlorophyllpigmente nicht im Extrakt stören. Der erhaltene Rohextrakt enthielt $0,12 \pm 0,005$ mg Bacosid A pro mg Extrakt, was einem Gehalt von $20,80 \pm 0,84$ mg Bacosid A pro g *B. monnieri* gerechnet auf die Trockenmasse des Pflanzmaterials ergab. Im Vergleich mit dem erhaltenen Wert der Vorversuche im kleinen Maßstab von $20,28 \pm 1,82$ mg Bacosid A pro g *B. monnieri* hatte die Extraktion im großen Maßstab keinen Einfluss auf den Bacosidgehalt. Verglichen mit der Literatur ist der Wert von 1,2 % Bacosid A im Extrakt im Durchschnitt. Bhandari et al. haben in einer Untersuchung von 2009 den Bacosid A Gehalt in neun verschiedenen Proben bestimmt, wobei dieser im Mittel 0,65 % im Extrakt betrug [153]. Uabandit et al. geben in einer Studie von 2010 an, dass deren Extrakt 5 % Bacosid A enthielt [30]. Dabei hängt der Gehalt an Bacosiden immer auch von der Extraktionsmethode, den verschiedenen Pflanzenteilen, den verschiedenen Wachstumsstadien und der Saison, in der geerntet wird, ab [153-155].

Der gewonnene hydro-methanolische Extrakt wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion weiter separiert. Entgegen einer Vielzahl an in der Literatur beschriebenen Flüssig-Flüssig-Extraktionen zur Anreicherung von Saponinen wurde nicht gegen Ethylacetat und danach gegen Butanol ausgeschüttelt [149], da der in Wasser gelöste Extrakt und die Ethylacetatphase mischbar waren und keine Trennung im Scheidetrichter erfolgte. Der gewonnene Rohextrakt wurde in Wasser gelöst und mittels Hexan, Chloroform (anstelle von Ethylacetat) und Butanol ausgeschüttelt [156].

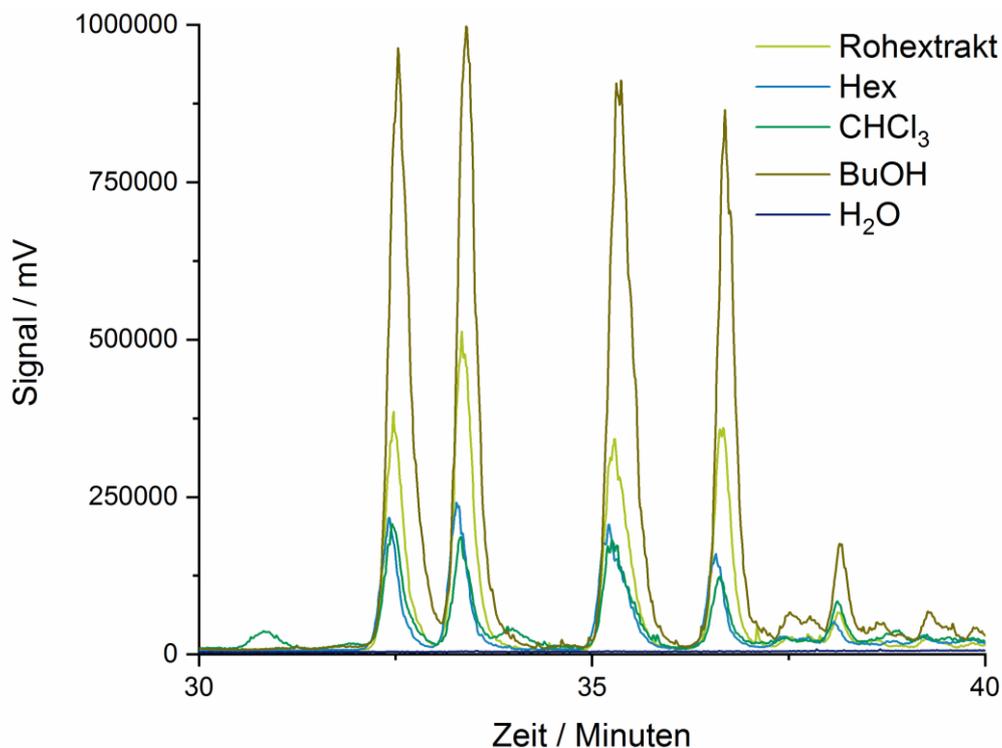


Abbildung 16: Darstellung der HPLC-ELSD Chromatogramme des Bacosidanteils (Methode 1) des Rohextraktes und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte (Hex = Hexanextrakt, CHCl₃ = Chloroformextrakt, BuOH = Butanolextrakt, H₂O = Wasserextrakt) (10 mg/mL).

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hexan, Chloroform und Butanol erfolgte die Anreicherung der Bacoside in die Butanolfraktion. Im Vergleich zum Rohextrakt enthielt die Butanolfraktion der Flüssig-Flüssig-Extraktion knapp die doppelte Menge $0,21 \pm 0,01$ mg Bacosid A pro mg. Im Vergleich ist der erhaltene Gehalt von 21 % Bacosid A im Butanolextrakt mit den Werten von Pham et al., welche einen Wert von 21,8 % Bacosid A beschreiben, nahezu identisch [157]. Es wurden in der Hexan- und der Chloroformfraktion auch Bacoside nachgewiesen, was durch ihren amphiphilen Charakter erklärt werden kann (Hexanfraktion: $0,086 \pm 0,02$ mg Bacosid A pro mg Extrakt, Chloroformfraktion: $0,083 \pm 0,005$ mg Bacosid A pro mg Extrakt). Im gewonnenen Wasserextrakt waren keine Bacoside nachweisbar. Da die Anreicherung der Bacoside in die Butanolphase erfolgreich war, wurde im Folgenden mit diesem Extrakt weitergearbeitet, um eine weitere Anreicherung der Bacoside zu erzielen.

Festphasenextraktion (SPE) als Anreicherungsmethode

Eine Trennung der verschiedenen in *B. monnieri* enthaltenen Substanzklassen wurde über die Festphasenextraktion (SPE) versucht. Dies ist eine einfache Methode, die eine Probenanreicherung erleichtert [158]. Die dargestellten Chromatogramme, aufgenommen über HPLC-IT TOF zeigen, dass die Anreicherung verschiedener Substanzen erfolgreich war. Dabei wurde die Butanolfraktion, in welcher bereits die Bacoside angereichert sind, weiter aufgereinigt.

Weiterhin zeigen die mittels HPLC-IT TOF aufgenommenen Chromatogramme, dass bei der ersten Extraktion mit Wasser nahezu keine Substanzen von der SPE-Kartusche gespült wurden. Die Darstellung der einzelnen mittels Festphasenextraktion erhaltenen Fraktionen zeigt, dass eine Fraktionierung erfolgreich war. Dabei zeigt Abbildung 17 auch, dass die Bacoside im Festphasenextrakt (60/40) deutlich besser im positiven Ionenmodus ionisieren. Der Vergleich mit Referenzsubstanzen mittels HPLC-ELSD und HPLC-IT TOF ergab, dass Luteolin-7-glucosid im Festphasenextrakt (80/20), Luteolin und Apigenin (in Spuren) im Festphasenextrakt (70/30), Bacosid A im Festphasenextrakt (60/40) und Betulinsäure im Festphasenextrakt (MeCN) enthalten waren. Nachdem die Anreicherung von Bacosid A das Ziel dieser Extraktionsoptimierung war, wurde im Folgenden der Anreicherungsfaktor vom Rohextrakt bis zum endgültig erhaltenen Festphasenextrakt bestimmt.

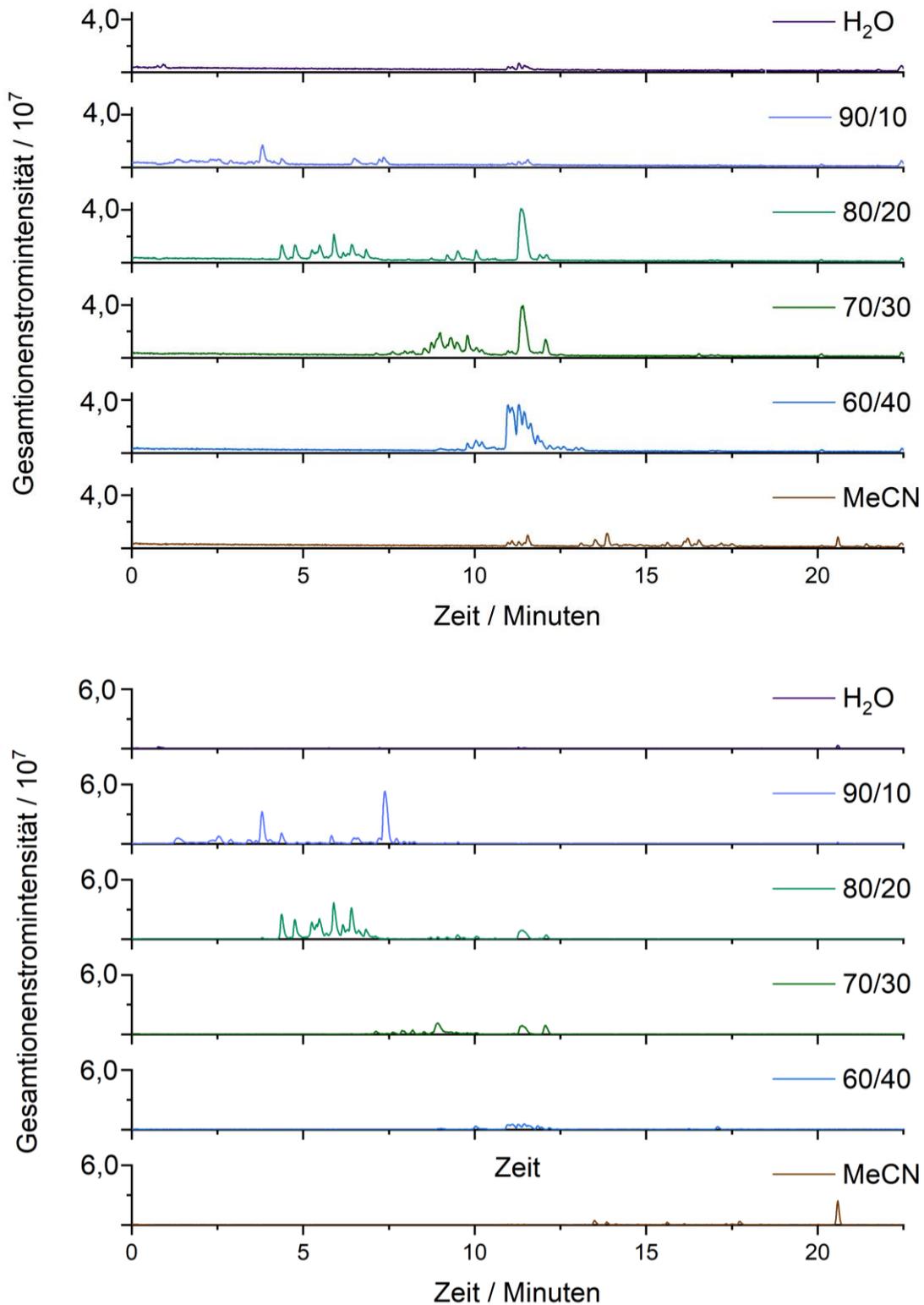


Abbildung 17: Oben: Darstellung der HPLC-IT TOF Chromatogramme (1mg/mL) der gewonnenen SPE Fraktionen im Bereich von 0-25 Minuten (Positiv-Ionenmodus) (Methode 3). Unten: Darstellung der HPLC-IT TOF Chromatogramme (1 mg/mL) der gewonnenen SPE Fraktionen im Bereich von 0-25 Minuten (Negativ-Ionenmodus) (Methode 3).

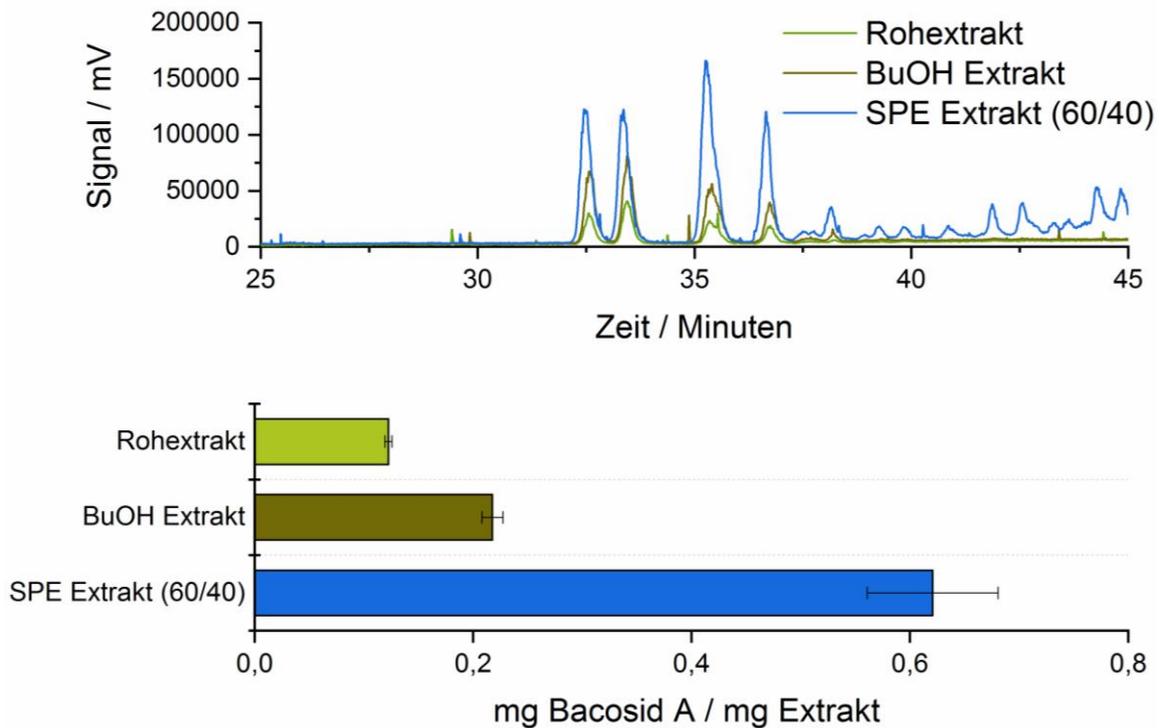


Abbildung 18: Oberer Abschnitt: Vergleich der HPLC-ELSD Chromatogramme (Methode 1) des Rohextraktes, des BuOH Extraktes und des SPE Extraktes (60/40) (1 mg/mL). Unterer Abschnitt: Darstellung der Anreicherung des Bacosid A Gehaltes zwischen Rohextrakt, BuOH Extrakt und SPE Extrakt in mg Bacosid A/mg Extrakt.

Bei den vier Hauptpeaks im dargestellten Chromatogramm handelt es sich um das Substanzgemisch Bacosid A. Dabei wurde der Gehalt an Bacosid A vom Rohextrakt auf knapp die doppelte Menge im Butanolextrakt der Flüssig-Flüssigextraktion angereichert. Die erneute Anreicherung um den knapp dreifachen Faktor auf $0,62 \pm 0,059$ mg Bacosid A pro mg Extrakt wurde mittels Festphasenextraktion erreicht. Der Anreicherungsfaktor zwischen dem Rohextrakt und dem Festphasenextrakt (60/40) lag bei fünf. Chatterjee et al. beschreiben in einer Publikation von 2010, dass ein hydro-ethanolischer BME einen Gehalt von 55-60 % Bacosiden, welche als Bacosid A identifiziert wurden, enthielt [159]. Hierbei wurde jedoch der Gehalt mittels saurer Hydrolyse der Saponine über das Aglykon bestimmt, wodurch möglicherweise andere enthaltene Bacoside auch als Bacosid A identifiziert wurden, weshalb der Gehalt eventuell höher war. Im Vergleich zu dieser Bestimmungsmethode empfiehlt sich die Bestimmung des Bacosid A Gehaltes mittels einer Kalibrierung wie durchgeführt, da der hier bestimmte Wert exakt ist. Im Vergleich mit einem US-Patent von Gokaraju et al. von 2005, welches eine Anreicherung von Bacosid A und Bacosid B von bis zu 100 % beschreibt, ist der mittels einer Festphasenextraktion erhaltene Wert von etwa 62 % passabel [160]. Die beschriebenen 100 % an Bacosiden wurden mittels chromatographischer Aufreinigung erhalten [160]. Obwohl bis dato die genaue Zusammensetzung von Bacosid B unbekannt bleibt, wurde eine Anreicherung davon in diesem Patent beschrieben [160].

Neben dem Ziel der Festphasenextraktion, die Bacoside anzureichern, konnte noch eine weitere Substanz stark angereichert werden. Hierbei handelt es sich um Luteolin, wofür im Folgenden der Anreicherungsfaktor bestimmt wurde.

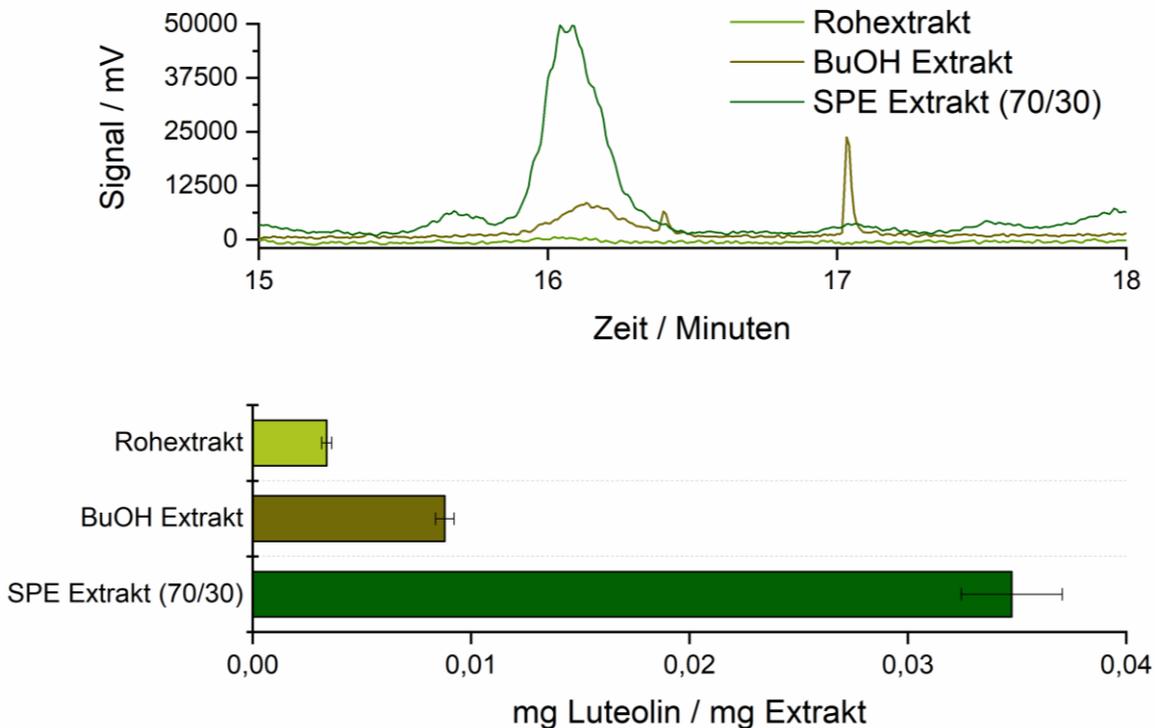


Abbildung 19: Oberer Abschnitt: Vergleich der HPLC-ELSD Chromatogramme (Methode 1) des Rohextraktes, des BuOH Extraktes und des SPE Extraktes (70/30) (1 mg/mL). Unterer Abschnitt: Darstellung der Anreicherung des Luteolin Gehaltes zwischen Rohextrakt, BuOH Extrakt und SPE Extrakt in mg Luteolin/mg Extrakt.

Der Gehalt an Luteolin im Rohextrakt von $0,0034 \pm 0,0002$ mg Luteolin/mg Extrakt wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion auf mehr als doppelte Menge $0,0088 \pm 0,0004$ mg Luteolin/mg Extrakt erhöht. Die erneute Anreicherung um den knapp fünffachen Faktor auf $0,035 \pm 0,002$ mg Luteolin/mg Extrakt wurde mittels SPE erreicht. Der Anreicherungsfaktor zwischen dem Rohextrakt und dem SPE Extrakt (70/30) lag bei zehn. Für Luteolin werden in der Literatur zu *B. monnieri* vereinzelt Gehalte beschrieben. Die bestimmten Gehalte von 0,22 % von Rajasekaran et al. und von 0,29 % von Shinomol und Muralidhara lagen jeweils etwas unter dem bestimmten Gehalt von 0,34 % im Rohextrakt [68, 100]. Diese Abweichung kann erneut damit erklärt werden, dass der Gehalt verschiedener Substanzen in einem Extrakt von vielen Einflussgrößen abhängt. Weiterhin ist Apigenin als Flavonoid in *B. monnieri* beschrieben. Im Gegensatz zu den Literaturstellen, die einen Gehalt von 0,12-0,45 % von Apigenin im Rohextrakt beschreiben, war diese Substanz im erhaltenen Extrakt nur in Spuren zu finden [68, 100].

4.3 Diskussion der Extraktion

Diese durchgeführten Vorversuche zeigen, dass es sehr wichtig ist, Untersuchungen zum Extraktionsmittel zu machen, da die Literatur zum einen eine Vielfalt an Extraktionsmitteln beschreibt und zum anderen keine Klarheit darüber herrscht, welches Extraktionsmittel bzw. welches Verhältnis an Extraktionsmitteln am besten geeignet ist zur Extraktion von Bacosiden. Die Durchführung der beschriebenen Vorversuche hat weiterhin gezeigt, dass auch wichtig ist, inwieweit die Methode im Labor praktikabel ist.

Die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) hat sich laut Literatur zur Trennung der Bacoside bewährt [153, 161, 162]. Die Detektion mittels UV ist bei Molekülen ohne Chromophor schwierig, wurde jedoch häufig angewendet [162, 163]. Bhandari et. al. haben die Detektion und Quantifizierung der Bacoside mit Hilfe des Lichtstredetektors beschrieben [153]. Diese Methode wurde in den durchgeführten Versuchen auch angewendet, um Probleme bei der Detektion der geringen Konzentrationen an Bacosiden im Extrakt zu umgehen.

Bei der Aufreinigung von pflanzlichen Extrakten ist die Aufarbeitung ein entscheidender Schritt. Hierfür ist die Festphasenextraktion eine vielfach angewendete Methode [158]. Ein Vorteil liegt darin, dass komplexe Extrakte damit gut aufgereinigt werden können, während die Methode nach den Prinzipien der Flüssigchromatographie funktioniert [158, 164, 165]. Bereits 1988 nutzte Oleszek die Festphasenextraktion zur Auftrennung von Saponinen aus *Medicago sativa* [166]. In der Literatur existiert noch keine weitere Anreicherungsverfahren der Bacoside aus *B. monnieri* mittels Festphasenextraktion. Im Vergleich zu dem Patent von Gokaraju et al. ist die entwickelte Methode deutlich leichter durchzuführen, da das Patent eine auf Kieselgel basierte Säulenchromatographie vorschlägt, welche möglicherweise wiederholt werden muss, um gute Ergebnisse zu erzielen [160]. Da vielerorts beschrieben wurde, dass die Bacoside in *B. monnieri* die aktiven Inhaltsstoffe sind, wurde somit gezeigt, dass eine Anreicherung dieser anhand einer gewöhnlichen Methode zur Aufarbeitung von Extrakten sehr gut möglich ist. Wie von Reznicek und Jurenitsch beschrieben, ist es fraglich, ob Triterpensaponine einzeln isoliert werden sollen oder ob die Untersuchung einer Stoffgruppe genügt [55]. Für das Screening der Naturstoffe in Bezug auf die Neurogenese wurde beschlossen, dass die Untersuchung der Stoffgruppe genügt.

Neben der Anreicherung der Bacoside als Stoffgruppe konnte auch Luteolin im Festphasenextrakt angereichert werden. In der Literatur gibt es für Luteolin in *B. monnieri* bis dato keine Anreicherungsverfahren, wobei beispielsweise Dehmoradkhani et al. die Anreicherung von Flavonoiden, unter anderem von Luteolin, aus *Artemisia biennis* mittels Festphasenextraktion beschrieben haben [167].

Im Laufe der Untersuchungen der unterschiedlichen Extrakte, welche mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und Festphasenextraktion erhalten wurden, wurden im Folgenden Referenzsub-

stanzen gekauft, um mit Hilfe der Retentionszeit dieser Substanzen im Extrakt enthaltene Substanzen zuordnen zu können. Außerdem sollte dadurch die Aktivität im Screening möglicherweise einzelnen Substanzen zugeordnet werden können.

4.4 Strukturaufklärung

Teile dieses Abschnitts sind bereits im Paper „Where Is Bacosine in Commercially Available *Bacopa monnieri*?“ veröffentlicht worden [168].

In der Literatur zur Pflanze *B. monnieri* werden zwei pentacyclische Triterpene als Inhaltsstoffe beschrieben. Hierbei handelt es sich um Bacosin und Betulinsäure, welche beide die Summenformel $C_{30}H_{48}O_3$ besitzen [74, 75].

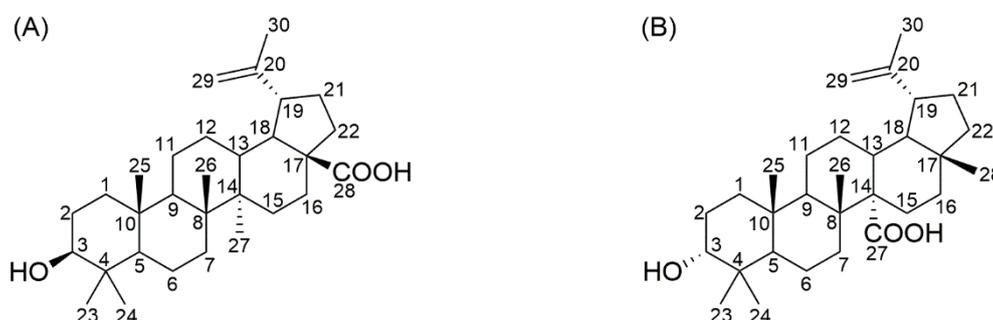


Abbildung 20: Darstellung der beiden Strukturisomere Betulinsäure (A) und Bacosin (B) mit der Summenformel $C_{30}H_{48}O_3$. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte nach IUPAC [168].

Abbildung 20 zeigt Betulinsäure (A), ((3 β)-3-Hydroxylup-20(29)en-28-säure) und Bacosin (B), ((3 α)-3-Hydroxylup-20(29)en-27-säure). Die beiden Konstitutionsisomere unterscheiden sich in der Anordnung der Carboxylgruppe und der Methylgruppe gebunden an C-14 und C-17. Des Weiteren ist die Orientierung der Hydroxygruppe gebunden an das C-3 Atom unterschiedlich. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird bei gemessenen Substanzen immer mit der Beschriftung der Betulinsäure gearbeitet (Bacosin (PhytoLab), Bacosin (ChromaDex), Betulinsäure (PhytoLab), Betulinsäure aus *B. monnieri* und NMR Vorhersagen für Betulinsäure). Bei einem Vergleich mit den Literaturdaten von Ahmed und Rahman und Kishore et al. und bei den NMR Vorhersagen für Bacosin wird die Nummerierung für Bacosin verwendet [74, 169]. Es herrscht in der Literatur jedoch Uneinigkeit, Ahmed und Rahman haben nicht alle Atome des Bacosin benannt, Kishore et al. beschreiben die Benennung der Methylgruppen C-23, C-24 und C-25 unterschiedlich als Ahmed und Rahman dargestellt [74, 169]. Ghosh et al. beschreiben die Nummerierung der Methylgruppen wie in Abbildung 20 und nach IUPAC [170].

Vohora et al. haben 1997 als erstes Bacosin in der Literatur beschrieben, wobei eine Arbeit von Ahmed und Finzi zitiert wird, die damals im Druck war [171]. Die beschriebene Literatur-

stelle ist heutzutage jedoch nicht verfügbar. Das Bacosin wurde aus den überirdischen Pflanzenteilen von *B. monnieri* (Herba Indica) anhand einer kalten Perkolation mit Ethanol extrahiert, anschließend wurde der Extrakt entfettet und mit Petrol, Ethylacetat und n-Butanol extrahiert. Die erhaltene Ethylacetatfraktion wurde auf einer Kieselgelsäule chromatographiert und mit Ethanol auskristallisiert. Das Produkt wurde mittels Schmelzpunktmessung (284-285 °C) untersucht und als Bacosin identifiziert. Da eine Schmelzpunktmessung jedoch nichts über die Zusammensetzung eines Moleküls und die Konfiguration funktioneller Gruppen an Stereozentren aussagt, ist es rätselhaft, wie Vohora et al. Bacosin identifizieren konnten. Dieses wurde anschließend auf die schmerzlindernde Wirkung bei mechanisch, chemisch und thermisch induzierten Stimuli in Mäusen untersucht. Dabei zeigte Bacosin bei mechanischen Reizen keinen analgetischen Effekt, bei chemisch und thermischen Reizen war die Substanz leicht aktiv.

Ahmed und Rahman haben im Jahr 2000 Bacosin als eine „neue“ Struktur aus den überirdischen Pflanzenteilen von *B. monnieri* (Herba Indica) isoliert und beschrieben [74]. Obwohl bereits Vohora et al. Bacosin in ihrer Veröffentlichung beschrieben haben, beschreiben Ahmed und Rahman das Triterpen als neu. Der *B. monnieri* Extrakt wurde mit einer ethanolischen Soxhlet Extraktion gewonnen. Dieser wurde im Anschluss in Wasser gelöst und mit Petrolether entfettet. Die wässrige Lösung wurde gegen Ethylacetat und n-Butanol ausgeschüttelt. Die gewonnenen Petrolether- und Ethylacetat Extrakte wurden vereinigt und über Kieselgel mit Petrolether, Benzol, Ethylacetat und Methanol weiter aufgereinigt. Bei einem Lösungsmittelverhältnis von Benzol/Ethylacetat (9/1) wurde Bacosin gewonnen. Die Struktur wurde mittels Schmelzpunktanalyse (284-285 °C); ^1H NMR; $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY NMR; ^{13}C NMR; ^{13}C attached proton test (APT); MS und IR aufgeklärt. Die chemischen Verschiebungen sind tabellarisch aufgeführt, jedoch sind die Spektren weder in der Publikation noch in der Supporting Information abgebildet. Auch die Auswertung des $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY NMR Spektrum beschränkt sich auf die Zuordnung der Hydroxygruppe am C-3 und auf die Isoprenylgruppe gebunden an C-19. Eine Auswertung der an C-14 und an C-17 gebundenen funktionellen Gruppen ist nicht dargestellt, wodurch die unvollständige Auswertung der Spektren auch hier Fragen offenlässt. Eine IR Messung dieses Moleküls wurde möglicherweise zur Vervollständigung der analytischen Daten durchgeführt, jedoch kann dadurch die komplexe Struktur nicht aufgeklärt werden.

Ghosh et al. haben 2010 die antidiabetische Wirkung von Bacosin in Alloxan-induzierten diabetischen Ratten untersucht [170]. Ein Extrakt der Pflanze *B. monnieri* (Salipur, Orissa, Indien) wurde mit einer ethanolischen Soxhlet Extraktion gewonnen, dieser wurde in Wasser gelöst und gegen Ethylacetat und n-Butanol ausgeschüttelt. Der gewonnene Ethylacetat Extrakt wurde über Kieselgel und einem Laufmittelgemisch aus Chloroform und Methanol aufgereinigt. Bei einem Lösungsmittelverhältnis von Chloroform/Methanol (95/5) wurden vier Fraktionen gewonnen, welche weiter über Dünnschichtchromatographie aufgereinigt wurden. Hierbei wurde Bacosin erhalten, welches mittels IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS und Schmelzpunktmessung (284-285 °C) untersucht wurde und mit den Daten von Ahmed und Rahman verglichen wurde.

Die in deuteriertem Chloroform gemessenen 1D NMR Daten (^1H NMR, ^{13}C NMR) sind in der Supporting Information der Publikation von Ghosh et al. erhältlich. Die Autoren haben in ihrer Studie gezeigt, dass Bacosin eine antidiabetische Wirkung gegenüber Alloxan-induzierten Ratten zeigt. Alloxan wird häufig als Modellschubstanz für Diabetes mellitus verwendet.

Eine weitere Studie von Kishore et al. aus dem Jahr 2017 untersuchte die Verbesserung der neuronalen Störung von Streptozotocin (STZ) induzierter diabetischer Neuropathie durch Bacosin in Ratten [169]. Überirdische Pflanzenteile von *B. monnieri* (Ch. Devi Lal Herbal Nature Park, Yamunanagar, Indien) wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln steigender Polarität nacheinander extrahiert. Die hierbei gewonnene Ethylacetat Fraktion wurde mit Chloroform und Methanol (95/5) auf einer Kieselgel-Säulenchromatographie aufgereinigt, wobei wie bei Ghosh et al. vier Fraktionen gewonnen wurden. Diese wurden in Chloroform und Methanol umkristallisiert, wodurch weiße kristalline Nadeln erhalten wurden. Die gewonnene Substanz wurde mittels ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR und Schmelzpunktmessung charakterisiert. In dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Gabe von Bacosin die Bildung des Reaktionsprodukts der Glykation (Advanced Glycation Endproduct; AGE) reduzierte und das oxidativ-nitrosative Stresslevel verbesserte. Dadurch könnten *B. monnieri* Extrakte Anwendung gegen Schmerzen induziert durch diabetische Neuropathie finden.

Da neben Bacosin auch Betulinsäure in *B. monnieri* bereits beschrieben ist, gibt es auch hierzu eine Studie zur Untersuchung der biologischen Aktivität. 2010 haben Viji et al. entfettetes Pflanzenmaterial der ganzen Pflanze *B. monnieri* (Kerala, Indien; November 2006) mit Methanol extrahiert und anschließend gegen Chloroform ausgeschüttelt [75]. Diese Chloroform Fraktion wurde mit Hexan und Ethylacetat auf einer mit Kieselgel-Säulenchromatographie aufgereinigt und anschließend mittels einer Mischung aus Hexan, Ethylacetat und Essigsäure eluiert. Bei einem Lösungsmittelverhältnis von Hexan/Ethylacetat/Essigsäure 7,5/2,5/0,03 wurde Betulinsäure gewonnen. Die Substanz wurde anhand einer Schmelzpunktmessung (295-298 °C) und einer ^1H NMR Messung als Betulinsäure identifiziert. Teile der NMR Daten, gemessen in deuteriertem Chloroform, sind in der Publikation angegeben. Anschließend wurde die gewonnene Betulinsäure auf die Lipopolysaccharid-stimulierte IL-6 Produktion in peripheren mononuklearen Blut-Zellen untersucht. Dabei zeigte die Betulinsäure antiinflammatorische Effekte durch die Inhibierung der IL-6 Produktion über die Inhibierung des NF- κ B Signalweg oder des p38-MAPK Signalweg.

Die Betulinsäure ist im Allgemeinen weitgehend bezüglich ihrer üblichen pharmakologischen Aktivitäten untersucht und wird in der Literatur als antikanzerogen, antibakteriell, antidiabetisch und antiinflammatorisch beschrieben [75, 172-174]. Zudem ist eine mögliche Wirkung gegen HIV, Malaria, Wurminfektionen und Bakterien beschrieben [172]. In der Literatur gibt es einige Stellen, die sowohl die Betulinsäure als auch das Bacosin als Inhaltsstoffe von *B. monnieri* beschreiben, hierbei handelt es sich jedoch fast ausschließlich um Review Artikel oder Artikel, welche nicht die biologische Aktivität eines der beiden oder beider Inhaltsstoffe untersuchen

[46, 175-179]. Nach bestem Wissen kann gesagt werden, dass es keine Literatur gibt, die beide Triterpene gleichzeitig in *B. monnieri* untersucht.

4.5 Eigene Ergebnisse der Strukturaufklärung

Schmelzpunktmessung

Da Vohora et al. Bacosin mittels einer Schmelzpunktmessung identifiziert haben [171], wurde zuerst von Bacosin und Betulinsäure der Schmelzpunkt gemessen. Der Wert der Zersetzung lag für beide Moleküle bei etwa 290 °C, wodurch eine Unterscheidung durch die Messung des Schmelzpunktes ausgeschlossen werden kann. Prinzipiell kann eine Struktur niemals nur durch die Messung eines Schmelzpunktes eindeutig bestimmt werden.

HPLC-ELSD

Um die Extrakte der Pflanze *B. monnieri* genauer zu untersuchen, wurde der gewonnene Rohextrakt und beide Referenzsubstanzen, Bacosin und Betulinsäure mittels HPLC-ELSD genauer untersucht. Diese Methode wird in der Literatur als geeignet zur Untersuchung von Triterpenen beschrieben [51].

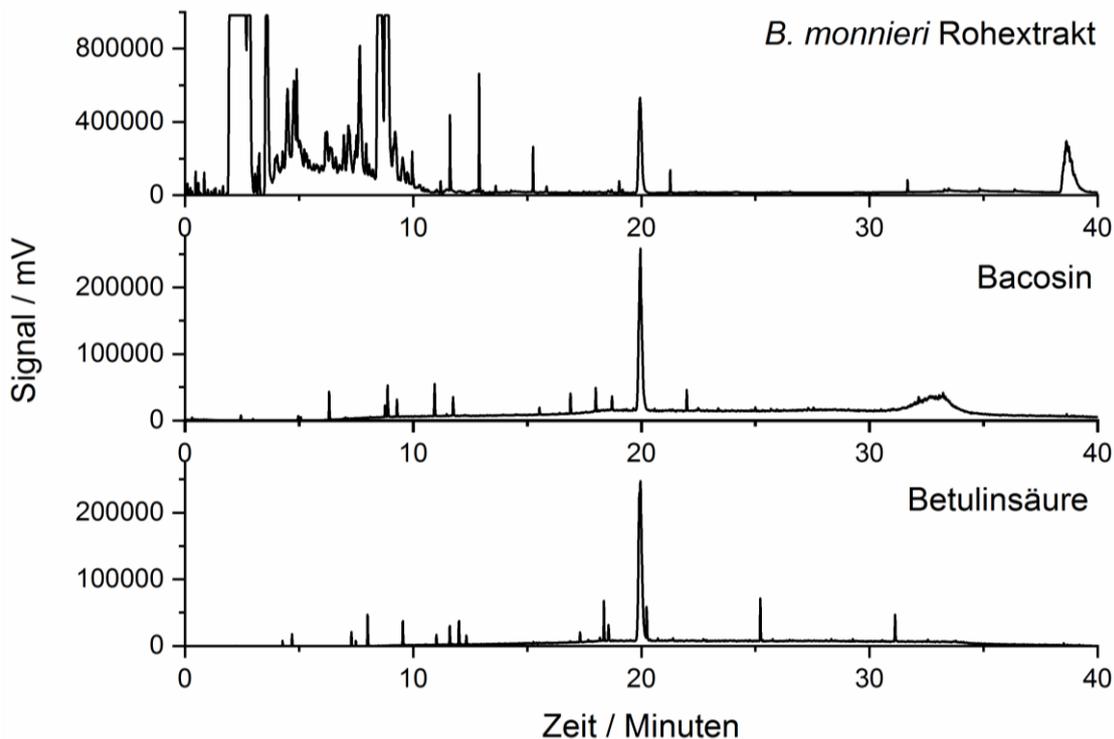


Abbildung 21: Darstellung der HPLC-ELSD Chromatogramme (Methode 2) des Rohextraktes aus *B. monnieri* und der beiden Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure.

Abbildung 21 zeigt die gemessenen Chromatogramme der beiden reinen Triterpene und des Rohextraktes der Pflanze *B. monnieri* mittels HPLC-ELSD, welche alle die gleiche Retentionszeit ($t_r = 20,0$ min) darstellen. Sowohl die im Extrakt enthaltene Substanz als auch die beiden Referenzsubstanzen zeigten hier das exakt identische Retentionsverhalten. Der direkte Vergleich der beiden Triterpene in der gleichen Konzentration zeigt, dass die Unterscheidung der beiden Substanzen mittels HPLC-ELSD unmöglich war. In der Literatur wurde das Vorkommen der Betulinsäure in *B. monnieri* diskutiert und auch mittels HPLC untersucht [75]. Viji et al. verwendeten eine nahezu identische Säule (C_{18} , 250 x 4,8 mm) zur Untersuchung der Betulinsäure in *B. monnieri* [75]. Zhang et al. haben die Auftrennung von zwei Strukturisomeren der Betulinsäure untersucht [180]. Hierbei handelte es sich um die Oleanolsäure und die Ursolsäure, welche mit der gleichen Säule (Phenomenex, Luna C_{18} 5 u 250 x 4,6 mm), die für die oben gezeigte Messung verwendet wurde, vermessen wurden [180].

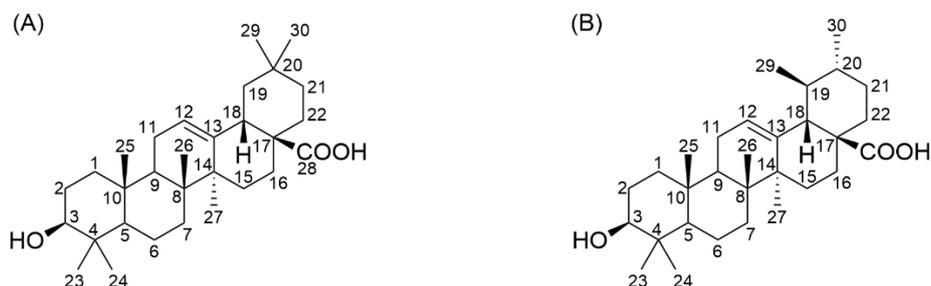


Abbildung 22: Darstellung der beiden Strukturen Oleanolsäure (A) und Ursolsäure (B) mit Nummerierung der Kohlenstoffatome nach IUPAC.

Die beiden zur Betulinsäure bekannten Strukturisomere unterscheiden sich in der Lage einer Methylgruppe gebunden an C-19 (Ursolsäure) bzw. C-20 (Oleanolsäure). Diese Untersuchung ergab zwei eindeutige Peaks mit unterschiedlichen Retentionszeiten, welche sich etwa in einer halben Minuten unterscheiden [180]. Alleine der Unterschied in der Lage einer Methylgruppe ergab für die beiden von Zhang et al. untersuchten Triterpene Unterschiede in der Retentionszeit, weswegen eine Unterscheidung von Bacosin und Betulinsäure mit der unterschiedlichen Lage der Methyl- und der Carboxylgruppe und der unterschiedlichen Orientierung der Hydroxygruppe möglich sein müsste. Da jedoch kein Unterschied in der Retentionszeit bestimmt wurde, ist davon auszugehen, dass die Substanzen identisch sind.

HPLC-IT TOF

Eine Untersuchung weiterer Extrakte aus verschiedenen Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmitteln und der gekauften und extrahierten Reinsubstanzen wurde mittels HPLC-IT TOF gemacht. Nur so kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Ununterscheidbarkeit um einen Gerätefehler handelt oder ein weiterer Peak mit derselben Masse bei unterschiedlicher Retentionszeit auftritt.

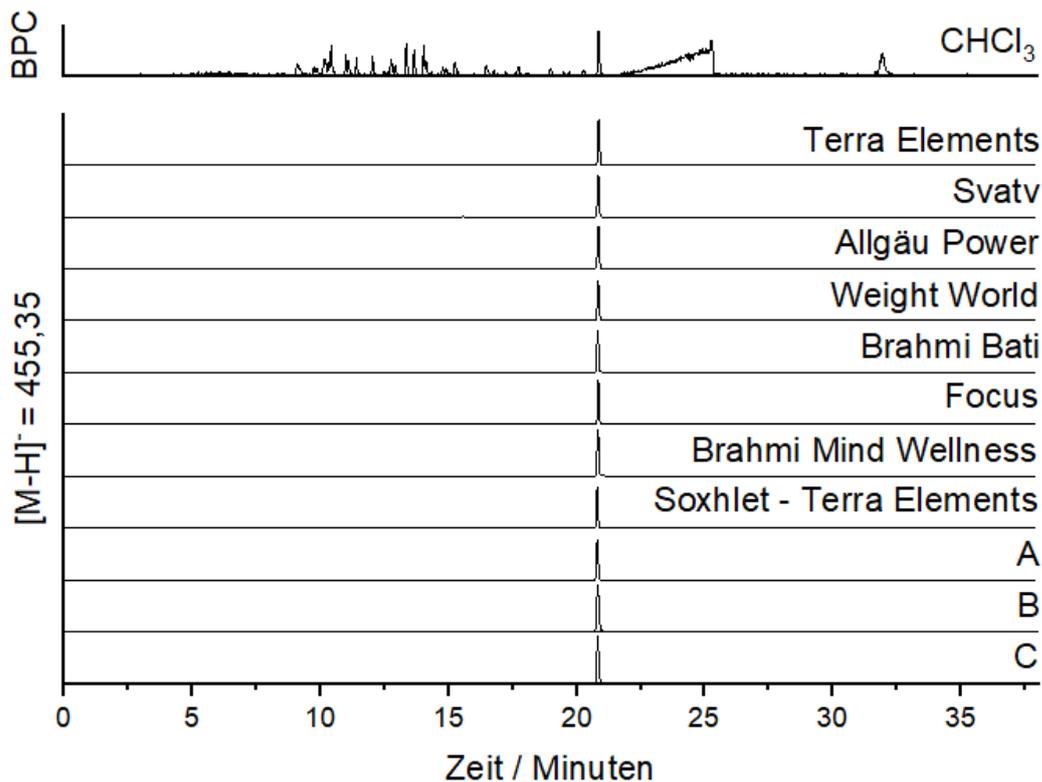


Abbildung 23: Darstellung der Untersuchungen verschiedener Extrakte und Reinsubstanzen mittels HPLC-IT TOF (Methode 3). Von oben nach unten: Basispeakchromatogramm des Chloroformextraktes (Terra Elements), extrahierte Negativ-Ionenmodus Massenspur $[M-H]^- = 455,35$ der Chloroformextrakte verschiedener Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmitteln verschiedenen Ursprungs und eines Soxhlet Extraktes aus Pflanzenmaterial von Terra Elements, der Reinsubstanz extrahiert aus *B. monnieri* (Terra Elements) (Betulinsäure) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (Phytolab) (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (Phytolab) (C).

Abbildung 23 zeigt, dass das Basispeakchromatogramm eines Chloroformextraktes und die ausgegebenen Massenspektren verschiedener untersuchter Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmittel einen einzigen Peak bei der gleichen Retentionszeit aufwiesen ($t_r = 20,8$ min). Dabei wurden neben dem Hauptpeak keine weiteren Peaks mit der gleichen Masse in keinem der untersuchten Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmittel erhalten. Bei Terra Elements (Deutschland), Svatv (Indien), Allgäu Power (Deutschland) und Weight World (England) handelt es sich um verschiedene Pflanzenmaterialien und bei Brahmi Bati (Indien), Focus (Deutschland) und Brahmi Mind Wellness (Indien) um unterschiedliche Nahrungsergänzungsmittel. Die genaue Zusammensetzung der Pflanzenmaterialien und der Nahrungsergänzungsmittel ist in Tabelle 6 zu finden. Die dargestellte Massenspur des Soxhlet Extraktes des Pflanzenmaterials der Firma Terra Elements (A) zeigt, dass auch der Extrakt, welcher mit derselben Methode wie durch Ahmed und Rahman beschrieben hergestellt wurde, auch keinen weiteren Peak mit derselben Masse und unterschiedlicher Retentionszeit enthielt. Die Extraktion wurde auf dieselbe Art durchgeführt, um ausschließen zu können, dass es Unterschiede bei den erhaltenen Substanzen durch die Anwendung verschiedener Extraktionsmethoden gibt.

GC-MS

Aufgrund der dargestellten HPLC-ELSD und HPLC-IT TOF Ergebnisse wurde als weitere unabhängige Methode die Messung eines GC-MS Spektrums durchgeführt. Um eine Detektion der beiden Triterpene im GC-MS möglich zu machen, war eine Alkylierung nötig, um etwaige Strukturunterschiede mittels der unterschiedlichen Fragmentierung herauszufinden [51]. In Abbildung 24 wird das GC-MS Spektrum dargestellt, wobei auch hier kein Unterschied in der Retentionszeit erkennbar war.

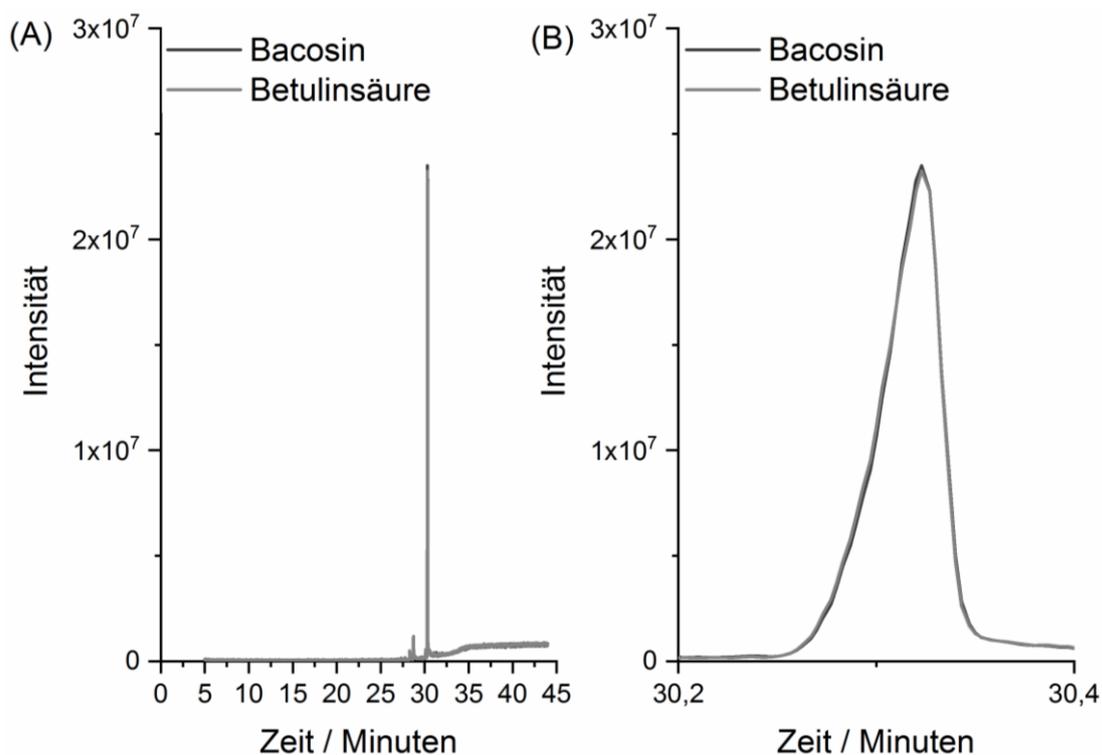


Abbildung 24: Darstellung der gesamten GC-MS Chromatogramme der Referenzsubstanzen Bacosin (dunkelgrau) und Betulinsäure (grau) von 0-45 Minuten (A) und Ausschnitt des Hauptpeaks in einem Bereich von 30,2-30,4 Minuten (B).

Die Retentionszeit der beiden methylierten Substanzen war exakt identisch ($t_r = 30,3$ min). Die erhaltenen Hauptfragmente waren: m/z (%): 470 (1), 411 (2), 395 (<1), 220 (5), 189 (23), 175 (11) und 43 (100), wobei die meisten erhaltenen Fragmente mit dem von Ayatollahi et al. erhaltenen Fragmentierungsmuster für die Betulinsäure übereinstimmen (Abbildung 25) [181].

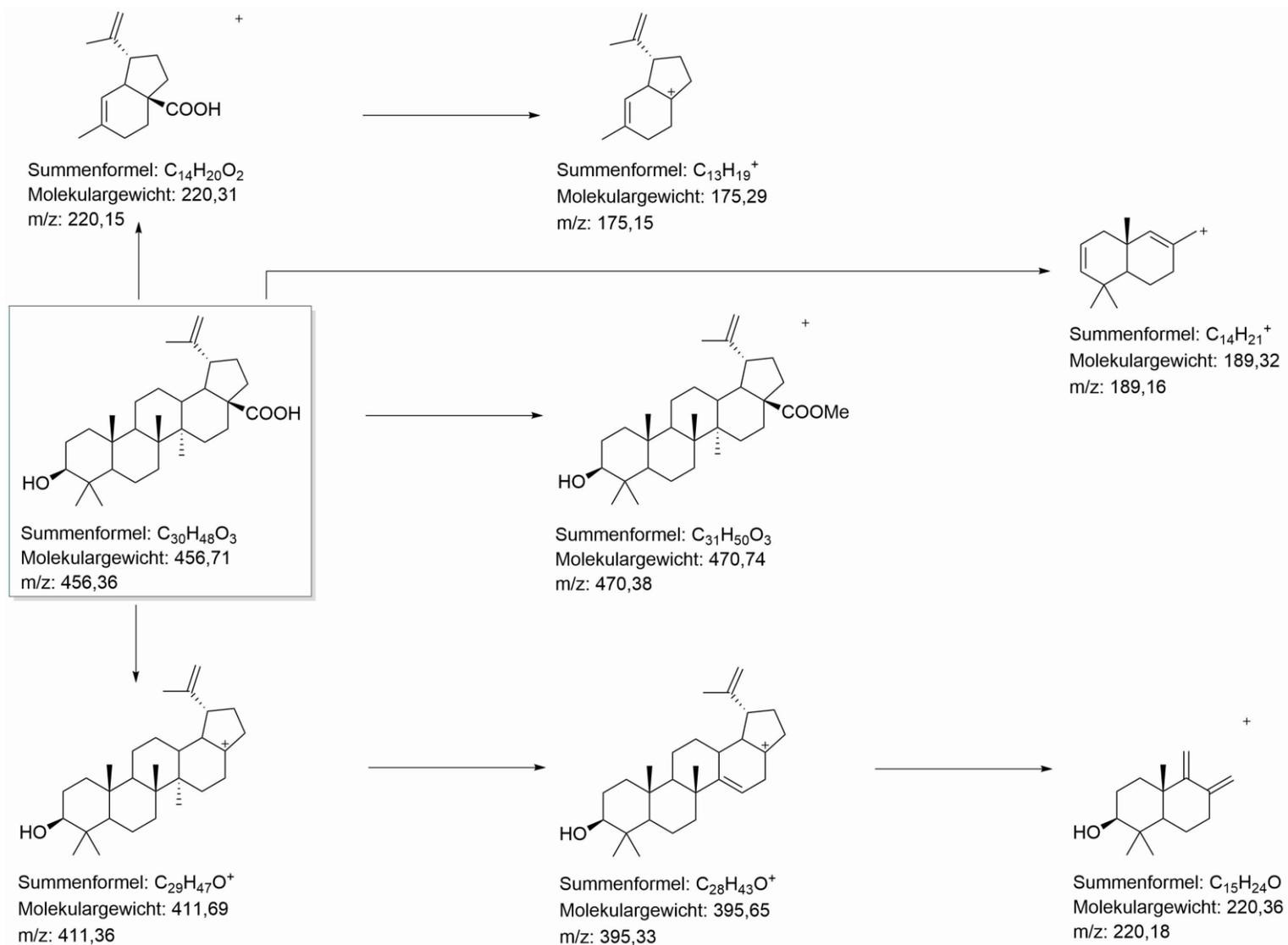


Abbildung 25: Darstellung des Fragmentierungsmusters der Betulinsäure angelehnt an Ayatollahi et al. [181].

Das gewonnene Fragmentierungsmuster deutete jedoch weder eindeutig auf Bacosin noch auf Betulinsäure hin, da die Fragmente zu groß waren und theoretisch beiden Substanzen zugeordnet werden können.

NMR

Die NMR spektroskopischen Untersuchungen wurden zusätzlich noch durch Prof. Dr. Eisenreich und seinem Doktoranden Thomas Geisberger an einem Bruker AV-III-HD Spektrometer (500 MHz) ausgeführt. Die NMR Messungen wurden durchgeführt, um mögliche Unterschiede erkennen zu können. Zuerst wurden Vorhersagen mit den Softwarepaketen von ChemDraw, MestreNova und ACD/Labs (on-line Version) gemacht, um signifikante Unterschiede beider Triterpene vorhersagen zu lassen. Dabei sind die Unterschiede der ^1H NMR Daten (Anhang Tabelle 10) nicht so signifikant wie die im Folgenden dargestellten ^{13}C NMR Daten.

Die in Tabelle 4 dargestellten ^{13}C NMR Daten zeigen die größte Differenz in der chemischen Verschiebung bei C-14 und C-17, je nach Bindung der Methylgruppe oder der Carboxylgruppe an das jeweilige C-Atom. Bei Bindung der Carboxylgruppe an das jeweilige C-Atom ist die chemische Verschiebung tieffeldverschoben. Die Bindung der beiden unterschiedlichen funktionellen Gruppen hat somit auch einen Einfluss auf die chemische Verschiebung der benachbarten C-Atome, weswegen hier die Diskrepanzen auch relativ hoch sind. Je nach Bindung an das C-14 oder C-17 ist im Falle von Betulinsäure (Bindung an C-17) C-28 hochfeldverschoben, im Falle von Bacosin (Bindung an C-14) wäre C-27 tieffeldverschoben. Durch die Vorhersagen sind deutliche Unterschiede erkennbar, welche auch bei der NMR Messung der verschiedenen Referenzsubstanzen sichtbar sein sollten. Die Vorhersage der beiden Moleküle mit beiden Programmen zeigt, dass die erhaltenen Ergebnisse leicht voneinander abweichen. Einzig ChemDraw weicht bei der Vorhersage von Bacosin im Vergleich zu den beiden anderen Programmen ab (C-14), jedoch stimmt die Vorhersage für die Betulinsäure relativ genau mit den gemessenen Werten für die aus *B. monnieri* gewonnene Betulinsäure überein.

Alle gemessenen NMR Spektren der Betulinsäure extrahiert aus *B. monnieri* und der beiden Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure ergaben jedoch keine Unterschiede, was in den folgenden Abbildungen dargestellt ist. Sowohl die 1D NMR Spektren (Abbildung 26 und Abbildung 27) als auch die 2D Spektren (Anhang, Abbildung 50-Abbildung 53) zeigten keine Unterschiede für die aus *B. monnieri* gewonnene Reinsubstanz und die beiden Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure.

Tabelle 4: Darstellung aller ^{13}C NMR Daten der Vorhersagen mit den unterschiedlichen Softwarepaketen (ACD/Labs, MestreNova, ChemDraw) im Vergleich mit den Daten der Reinsubstanz (Betulinsäure) gewonnen aus *B. monnieri* (Terra Elements) (starke Unterschiede: fettgedruckt und farbig).

C-Atom	ACD/Labs Bacosin	ACD/Labs Betulinsäure	Mestre Nova Bacosin (CDCl_3)	Mestre Nova Betulinsäure (CDCl_3)	Chem Draw Bacosin	Chem Draw Betulinsäure	Betulinsäure aus <i>B. monnieri</i> (CDCl_3)
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	39,50	36,86	39,3	37,6	38,4	38,4	38,70
2	27,60	26,78	27,2	27,2	27,4	27,4	27,40
3	75,10	77,94	78,3	78,3	78,6	78,6	79,01
4	39,60	39,42	38,7	38,7	38,8	38,8	38,87
5	49,70	54,27	55,9	54,0	55,2	55,3	55,33
6	18,47	19,20	18,7	18,3	17,1	18,5	18,29
7	37,68	34,06	37,1	34,1	34,9	35,2	34,31
8	40,84	40,92	41,4	41,1	34,7	40,7	40,68
9	51,60	50,79	51,3	50,4	46,9	50,6	50,51
10	37,46	38,81	37,6	37,2	37,1	37,8	37,03
11	21,20	23,37	21,8	21,1	21,4	21,4	20,85
12	26,89	25,67	26,1	25,9	30,2	26,1	25,49
13	38,68	38,98	37,0	38,8	34,4	38,6	38,35
14	59,60	41,51	58,9	42,6	69,8	42,5	42,44
15	25,80	30,95	25,1	30,5	23,4	29,9	29,70
16	37,81	32,58	35,8	32,8	39,7	32,0	32,14
17	42,81	56,38	42,8	56,8	42,7	56,8	56,24
18	51,31	50,04	50,0	49,0	48,1	49,3	49,24
19	47,58	48,60	48,1	48,6	47,7	48,0	46,87
20	151,07	150,42	150,4	151,1	150,3	150,3	150,42
21	29,93	30,25	29,8	31,0	29,8	30,8	30,52
22	40,31	38,56	39,7	37,7	40,0	37,1	37,20
23	15,98	22,29	22,6	22,6	23,4	23,4	27,99
24	23,43	23,97	22,6	22,6	23,4	23,4	15,37
25	24,87	18,23	17,2	16,5	16,1	16,1	16,15
26	17,60	20,37	17,8	16,1	18,9	18,8	16,02
27	17,41	18,68	179,5	14,9	180,3	15,0	14,70
28	18,47	179,52	19,4	179,6	18,5	179,2	179,37
29	110,09	109,68	109,6	110,0	110,6	110,6	109,74
30	19,37	19,41	19,6	19,7	21,7	21,7	19,37

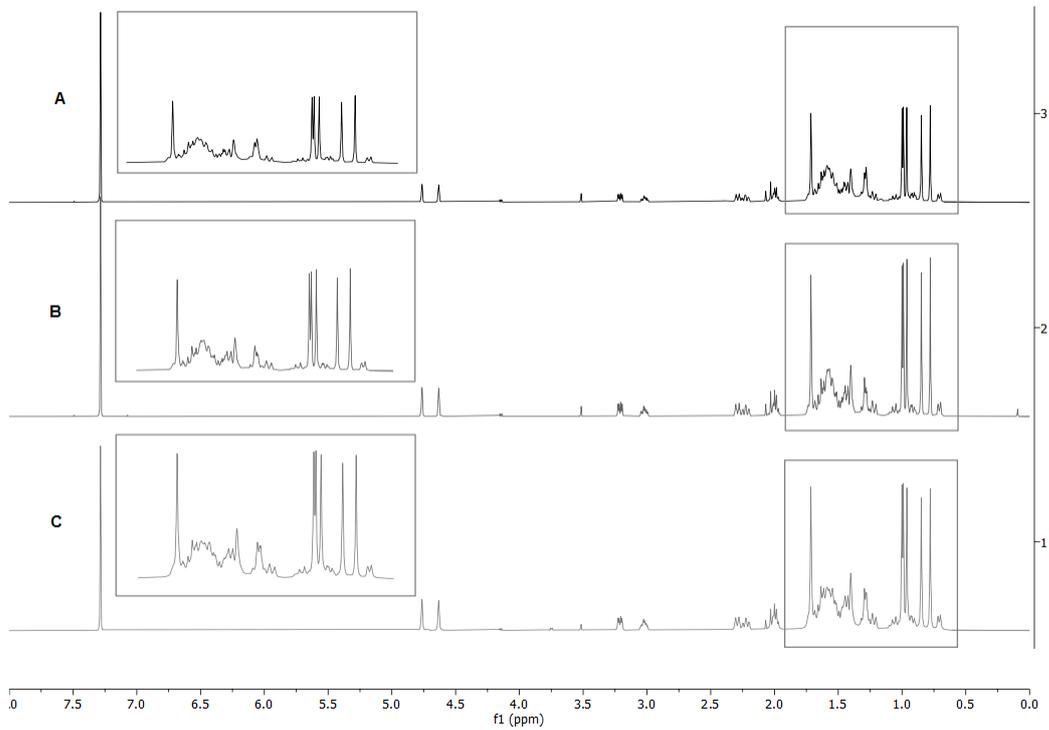


Abbildung 26: ^1H NMR Spektren der aus *B. monnieri* extrahierten Reinsubstanz (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].

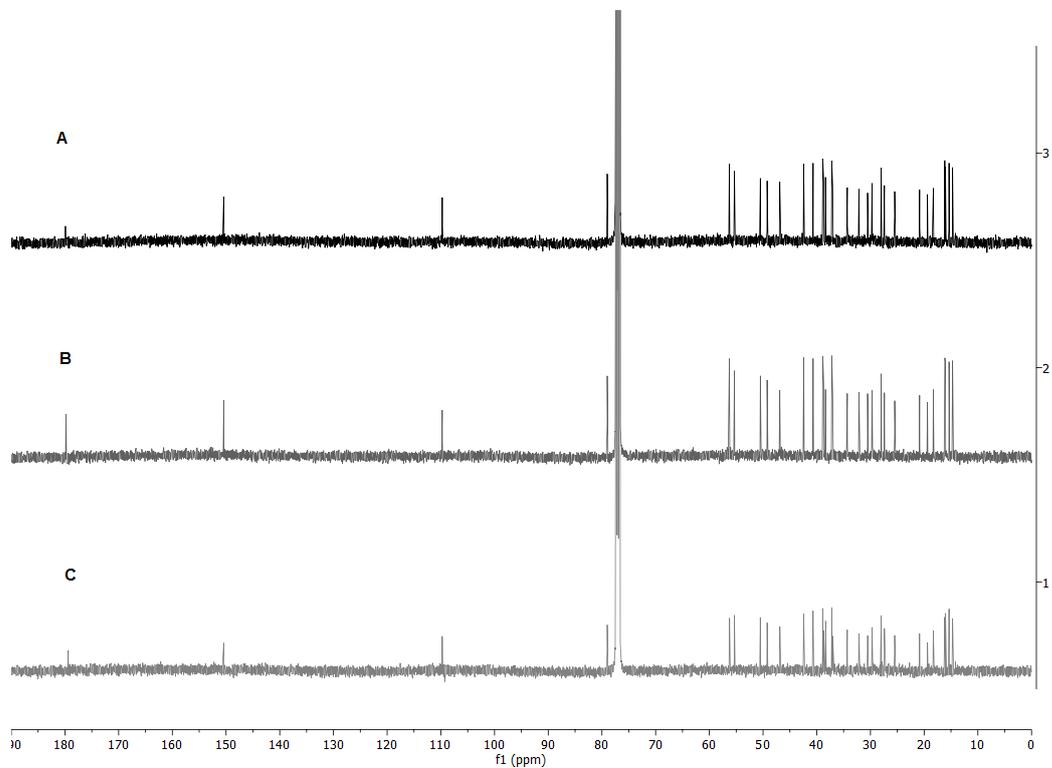


Abbildung 27: ^{13}C NMR Spektren der aus *B. monnieri* extrahierten Reinsubstanz (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].

Durch die Darstellung des ^1H NMR Spektrums wird deutlich, dass selbst die Bereiche, in welchen ein Großteil der Protonen zu finden ist (0,5-1,8 ppm), komplett identisch waren und sich in keiner chemischen Verschiebung unterschieden haben.

Die Darstellung des ^{13}C NMR Spektrums verdeutlicht, dass eine Unterscheidung der beiden Moleküle auch nicht durch die Untersuchung mittels 1D NMR möglich war. Durch die Vorhersagen mit den drei unterschiedlichen Softwarepaketen ist jedoch klar, dass ein sichtbarer Unterschied bei den chemischen Verschiebungen gegeben sein sollte. Die Darstellung des ^{13}C Spektrums offenbart, dass kein Unterschied in den chemischen Verschiebungen bei den drei gemessenen Substanzen festgestellt wurde. Ein weiterer Vergleich mit bereits untersuchtem Bacosin von Ahmed und Rahman und Kishore et al. zeigt, dass in deren gemessenen Spektren Unterschiede vorlagen. Tabelle 5 zeigt die vorhergesagten ^{13}C NMR Daten für die extrahierte Betulinsäure und das Bacosin im Vergleich zu den publizierten Daten für Bacosin von Ahmed und Rahman [74], Kishore et al. [169] und für Betulinsäure von Khaliq et al. [182]. Weiteres Bacosin (ChromaDex) wurde auch NMR spektroskopisch überprüft, da die Daten jedoch exakt identisch sind, sind diese nicht extra aufgeführt. Hierbei fällt auf, dass die Vorhersage für C-17 (Methylgruppe-Bacosin) relativ genau mit den gemessenen Daten übereinstimmt, wohingegen die Vorhersage von C-14 (Carboxylgruppe-Bacosin) mit den gemessenen Werten von Ahmed und Rahman und Kishore et al. nicht übereinstimmen.

Ghosh et al. haben die ^1H und ^{13}C NMR Spektren für Bacosin in der Supporting Information ihrer Publikation dargestellt, die Signale wurden jedoch nicht zugeordnet. Der Vergleich der Spektren von Ghosh et al. (gemessen in CDCl_3) mit den erhaltenen Spektren und der Literatur deutet jedoch darauf hin, dass Ghosh et al. Betulinsäure anstatt Bacosin extrahiert und untersucht haben. Die ^1H und ^{13}C NMR Daten der extrahierten Betulinsäure und der beiden Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure stimmen mit den beschriebenen Daten von Khaliq et al. (alle gemessen in CDCl_3) nahezu perfekt überein, die Differenzen liegen in der Nachkommastelle. Die ^{13}C NMR Daten von Ahmed und Rahman und Kishore et al. stimmen mit den gewonnenen Daten nicht überein. Der größte Unterschied liegt hier in den chemischen Verschiebungen des C-14 und des C-17 Atoms. Die bestimmten Daten von Ahmed und Rahman für C-14 und C-17 stimmen mit den Vorhersagen der unterschiedlichen Software Programme überein, jedoch nicht für C-15, C-16, C-18, C-19, C-22 und C-28. Dies deutet auf eine falsche Zuordnung der chemischen Verschiebung hin. Zudem fällt auch auf, dass C-23, welches im Falle von Bacosin laut Kishore et al. an C-10 gebunden ist, stark tieffeldverschoben ist [169]. Die beiden an C-4 gebundenen Methylgruppen C-24 und C-25 im Bacosin sind dagegen hochfeldverschoben, obwohl diese in direkter Nachbarschaft zu der Hydroxygruppe gebunden an C-3 sind. Da hier der Unterschied in der Benennung vorliegt, ist nicht auszuschließen, dass diese beiden Methylgruppen falsch zugeordnet wurden. Die Vorhersagen für Bacosin bestimmen auch tieffeldverschobenere Werte für die beiden Methylgruppen als für die Methylgruppe C-25 gebunden an C-10. Die gewonnenen ^1H NMR Daten sind im Anhang (Tabelle 11) zu finden.

Tabelle 5: Darstellung der ^{13}C NMR Daten der Vorhersagen mit den unterschiedlichen Softwarepaketen (ACD/Labs, MestreNova, ChemDraw), des Bacosins gewonnen von Ahmed und Rahman [74], des Bacosins gewonnen von Kishore et al. [169] und der Betulinsäure gewonnen durch Khaliq et al. [182] (starke Unterschiede: fettgedruckt und farbig).

C-Atom	ACD/Labs Bacosin	Mestre Nova Bacosin (CDCl_3)	Chem Draw Bacosin	Bacosin Ahmed und Rahman (CDCl_3) [74]	Bacosin Kishore et al. [169]	Betulinsäure Khaliq et al. (CDCl_3) [182]
	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	39,50	39,3	38,4	34,00	30,54	38,7
2	27,60	27,2	27,4	25,16	25,86	27,4
3	75,10	78,3	78,6	76,86	77,61	79,0
4	39,60	38,7	38,8	38,76	36,92	38,8
5	49,70	55,9	55,2	48,61	49,43	55,3
6	18,47	18,7	17,1	18,05	17,72	18,2
7	37,68	37,1	34,9	36,42	35,42	34,3
8	40,84	41,4	34,7	40,43	38,84	40,7
9	51,60	51,3	46,9	50,01	52,23	50,5
10	37,46	37,6	37,1	37,67	36,67	37,2
11	21,20	21,8	21,4	20,54	21,28	20,8
12	26,89	26,1	30,2	27,24	29,34	25,5
13	38,68	37,0	34,4	38,58	37,50	38,4
14	59,60	58,9	69,8	55,50	57,50	42,4
15	25,80	25,1	23,4	30,18	30,82	29,7
16	37,81	35,8	39,7	31,79	32,54	32,1
17	42,81	42,8	42,7	42,08	41,50	56,3
18	51,31	50,0	48,1	46,70	45,05	49,3
19	47,58	48,1	47,7	54,97	53,25	46,9
20	151,07	150,4	150,3	150,40	150,00	150,3
21	29,93	29,8	29,8	29,29	28,49	30,5
22	40,31	39,7	40,0	36,81	37,01	37,0
23	15,98	22,6	23,4	28,19	28,01	27,9
24	23,43	22,6	23,4	15,81	16,10	15,3
25	24,87	17,2	16,1	16,04	16,10	16,1
26	17,60	17,8	18,9	15,90	16,90	16,0
27	178,41	179,5	180,3	177,33	180,32	14,7
28	18,47	19,4	18,5	14,47	14,49	180,7
29	110,09	109,6	110,6	109,74	107,32	109,6
30	19,37	19,6	21,7	19,03	20,43	19,3

Die nennenswerten Unterschiede liegen hier in der chemischen Verschiebung des H-3, H-13 und H-18 bei Bacosin beschrieben durch Ahmed und Rahman und Kishore et al., wobei der Unterschied des H-3 in äquatorialer Position durch die axiale Hydroxygruppe im Bacosin ein deutlich tieffeldverschobenes Signal aufzeigt. Die Unterschiede für H-13 und H-18 sind durch ihre Nachbargruppen (Methyl- und Carboxylgruppe) zu erklären, wobei nicht einleuchtend ist, warum beide eine tieffeldverschobenere chemische Verschiebung aufweisen als in den gemessenen Daten für die Betulinsäure. Auch die vorhergesagten Daten stimmen für Bacosin

nicht mit den gemessenen Daten von Ahmed und Rahman und Kishore et al. überein. Bei genauer Betrachtung der gemessenen Kopplungskonstanten für H-5 von Ahmed und Rahman ($J = 7,5 \text{ Hz}$, $J = 5,0 \text{ Hz}$) im Vergleich zu den Daten von Khaliq et al. ($J = 9,3 \text{ Hz}$, $J = 3,0 \text{ Hz}$) und den erhaltenen Daten ($J = 9,5 \text{ Hz}$) fällt ein großer Unterschied auf [74, 182]. Möglicherweise ist beim gemessenen Bacosin von Ahmed und Rahman der erste Ring dieser Sessel-Sessel-Sessel-Sessel-Boot Konformation nach unten geklappt. Dies ist zwar sehr unwahrscheinlich, da dies eine seltene Struktur ist, wäre jedoch eine Erklärung für die gemessenen Daten von Ahmed und Rahman.

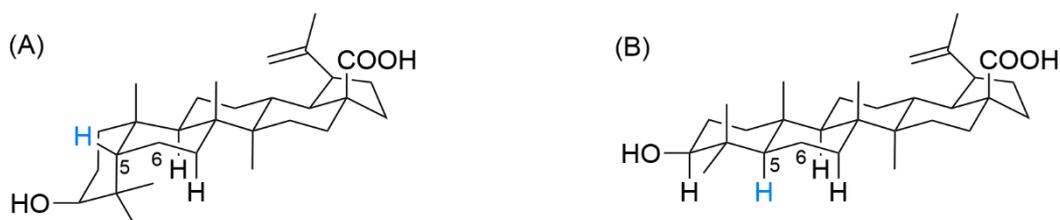


Abbildung 28: Verdeutlichung der Strukturen mit unterschiedlichen Sessel-Sessel-Sessel-Sessel-Boot Konformationen und dem 5-H-Atom (blau), (A): mögliche Struktur gemessen durch Ahmed und Rahman und (B): Betulinsäure.

Abbildung 28 zeigt, dass sich der Diederwinkel bei (A) zwischen dem H-Atom an Position 5 und den beiden H-Atomen an Position 6 deutlich unterscheidet zu denen bei der in (B) dargestellten Struktur der Betulinsäure. Die Winkel bei B liegen etwa bei Werten von etwa 60° und 180° , wofür die 3J -Kopplungskonstanten von $^3J_{ae} = 3,0 \text{ Hz}$ und $^3J_{aa} = 9,3 \text{ Hz}$ von Khaliq et al. gut mit den erwarteten Werten ($^3J_{ae} = 2-5 \text{ Hz}$ und $^3J_{aa} = 7-12 \text{ Hz}$) übereinstimmen [183]. Die Winkel für die in (A) dargestellte Struktur sollten sich für die beiden Kopplungskonstanten auf $^3J_{ae}$ und bei $^3J_{ee}$ auf etwa 60° belaufen, wodurch die gemessenen Werte von Ahmed und Rahman von $7,5 \text{ Hz}$ und $5,0 \text{ Hz}$ dafürsprechen, dass der Ring nach unten geklappt ist. Andernfalls wäre eine große Kopplungskonstante zu erwarten.

Werden die wenigen beschriebenen ^1H NMR Daten von Viji et al. für Betulinsäure mit den erhaltenen Daten verglichen, sind diese nahezu identisch. Die NMR Daten für Bacosin von Ahmed und Rahman, Kishore et al. und Ghosh et. al. sind alle 1D NMR Daten. Zur Aufklärung und Verifizierung der komplexen Struktur und deren Unterschiede von Betulinsäure oder Bacosin ist jedoch ein 2D NMR Experiment nötig, um Kopplungen eindeutig feststellen zu können.

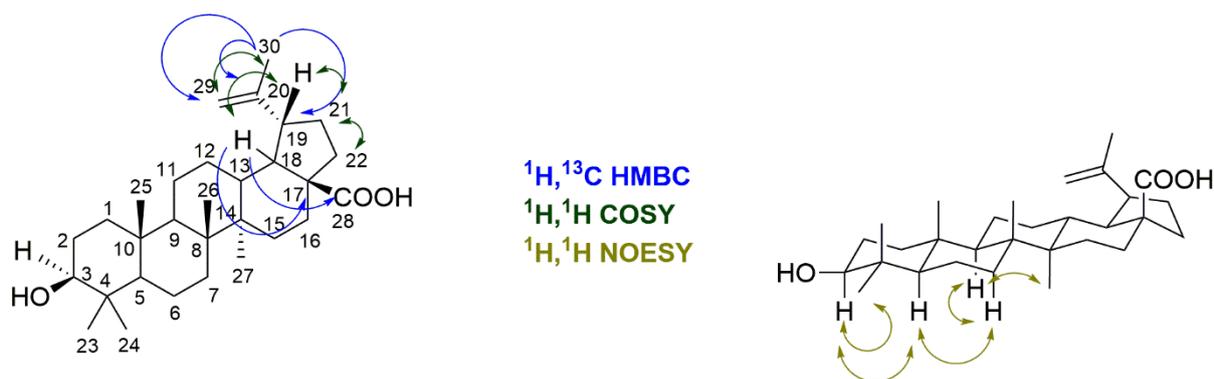


Abbildung 29: Darstellung der gemessenen $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY Kopplungen für die Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure und für die Betulinsäure extrahiert aus *B. monnieri* [168].

Durch die Auswertung der $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC; $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY Spektren wurde ein Kopplungsmuster identifiziert, welchem ausschließlich die Betulinsäure zugeordnet werden konnte (Abbildung 29). Dabei wurde ein Kopplungsmuster der $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC und $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY Kopplungen ausgehend von der Doppelbindung zwischen C-20 und C-29 aufgestellt und dadurch die Position der Carboxylgruppe bestimmt. Die an C-29 gebundenen H-Atome ($\text{H}\alpha\text{-29}$ $\delta = 4,76$ ppm, $\text{H}\beta\text{-29}$ $\delta = 4,63$ ppm) sind tieffeldverschoben aufgrund der Doppelbindung, weswegen diese eindeutig zugeordnet werden konnten. Eine Kopplung dieser beiden H-Atome mit der Methylgruppe (H-30 $\delta = 1,71$ ppm) ist im $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY Spektrum zu erkennen ($\text{H}\alpha\text{-29} \rightarrow \text{H-30}$, $\text{H}\beta\text{-29} \rightarrow \text{H-30}$). Im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC Spektrum ist eine Kopplung zwischen dem H-30 ($\delta = 1,71$ ppm) und dem C-19 ($\delta = 46,89$ ppm) zu erkennen. Durch $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY Kopplung zwischen H-19 ($\delta = 3,02$ ppm) und H-18 ($\delta = 1,61$ ppm) und die $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC Kopplung zwischen H-18 ($\delta = 1,61$ ppm) und C-17 ($\delta = 56,27$ ppm) und H-18 ($\delta = 1,61$ ppm) und C-28 ($\delta = 179,91$ ppm) konnte ausgeschlossen werden, dass die Carboxylgruppe an C-14 gebunden ist. Die Korrelation zwischen zwei Kernen ist im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ Spektrum sehr selten über vier Bindungen hinweg als ^4J -Kopplung zu sehen [183]. Durch die $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY Kopplungen kann die Lage der Methylgruppe eindeutig bestimmt werden. Das Kopplungsmuster der $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY Spektren zeigt, dass H-3 ($\delta = 3,21$ ppm) mit H-5 ($\delta = 0,70$ ppm), H-5 ($\delta = 0,70$ ppm) mit H-7 ($\delta = 1,37$ ppm), H-7 ($\delta = 1,37$ ppm) mit H-9 ($\delta = 1,27$ ppm) und H-9 ($\delta = 1,27$ ppm) mit der Methylgruppe H-27 ($\delta = 1,00$ ppm) koppeln. Anhand des aufgestellten Kopplungsmusters muss die Methylgruppe an C-14 und die Carboxylgruppe an C-17 gebunden sein, wodurch es sich bei allen drei gemessenen Substanzen um Betulinsäure handeln muss.

4.6 Diskussion der Strukturaufklärung

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in den untersuchten *B. monnieri* Extrakten nur Betulinsäure in detektierbaren Mengen enthalten war. Bacosin war hier nicht detektierbar. Auch

bei dem käuflich erworbenen Bacosin handelte es sich um Betulinsäure. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Ahmed und Rahman und Kishore et al. damals möglicherweise Bacosin aus *B. monnieri* extrahiert haben, da die beschriebenen NMR Untersuchungen in gewisser Weise Unterschiede aufzeigen. In Bezug auf mehrere Publikationen, welche sich mit der biologischen Aktivität des Bacosins befassen, wäre es im Nachhinein jedoch sinnvoll, 2D NMR Experimente mit Originalproben durchzuführen, um die Richtigkeit der publizierten Daten zu bestätigen. Sollten diese Experimente ergeben, dass auch in den früheren Untersuchungen kein Bacosin vorlag, sollten diese Publikation zurückgezogen oder verbessert werden.

Vohora et al. haben als erstes Bacosin beschrieben und auf seine schmerzlindernde Wirkung untersucht, welche für Betulinsäure bereits beschrieben ist [171, 173]. Ghosh et al. zeigen die antidiabetische Wirkung von Bacosin [184]. Da jedoch in der Supporting Information zu dieser Publikation die ^1H und ^{13}C NMR Spektren von Bacosin dargestellt sind und diese den gewonnenen Werten der Betulinsäure gleichen, ist davon auszugehen, dass in ihrer Studie die antidiabetische Wirkung von Betulinsäure untersucht wurde. Dies wurde bereits hinreichend untersucht und ist bekannt [170, 174]. Auch Kishore et al. haben die biologische Aktivität von Bacosin im Hinblick auf die Verbesserung der neuronalen Funktionsstörungen von Streptozotocin (STZ) induzierter diabetischer Neuropathie untersucht, wobei eine ähnliche Studie zur Betulinsäure ähnliche Ergebnisse zeigte [169, 185].

Die Publikation von Mishra et al. zur Untersuchung von Brustkrebs bei Mäusen beschreibt einen IC_{50} Wert für kommerziell erworbenes Bacosin (Natural Remedies Pvt. Ltd., Bangalore, Indien) auf 4T1 Zellen von 21 μM und zum Vergleich der gewonnenen Daten wird die Betulinsäure herangezogen, die auf MEL-2 Zellen zytotoxisch war [186]. Da hier ein Vergleich zwischen der Toxizität von Bacosin und Betulinsäure herangezogen wurde, sollte dieser möglichst kritisch betrachtet werden, da es sich auch hier möglicherweise um Betulinsäure gehandelt hat [186]. Die von Vohora et al., Ahmed und Rahman, Ghosh et al. und Kishore et al. benutzten Analysemethoden wie IR, Schmelzpunktmessung, MS und 1D NMR Experimente sind bei der Strukturaufklärung eines derart komplexen Moleküls nicht ausreichend [74, 169-171].

Für künftige Studien zum Chloroform Extrakt von *B. monnieri* oder dem enthaltenen Triterpen bietet sich die Verwendung besser auflösender Analysemethoden an. Hierfür eignen sich 2D NMR Experimente und die hochauflösende Massenspektrometrie, um fehlerhafte Strukturaufklärungen künftig zu vermeiden [187]. Nicolaou und Snyder beschreiben in ihrem Aufsatz, welche weitreichende Folgen eine fehlerhafte Strukturaufklärung zur Folge haben kann. Dabei warnen die Autoren davor, dass dadurch falsche Vorschläge für die Biosynthese von Naturstoffen entstehen können [187]. Bei genauer Betrachtung der Biosynthese von Lupanen ausgehend vom (S)-2,3-Oxidosqualen ist als Produkt nur Betulinsäure mit einer β -Hydroxygruppe möglich [179, 188], weswegen die Existenz von Bacosin mit der α -Hydroxygruppe stark angezweifelt wird.

5 Untersuchung der Neurogenese

Da viele neurodegenerative Erkrankungen mit einem Funktionsverlust von Zellen einhergehen, muss aufgrund der immer älter werdenden Gesellschaft und der damit verbundenen hohen Anzahl an Erkrankungen das Ziel sein, geschädigte Areale im Gehirn zu regenerieren [4]. Lange Zeit galt die Meinung, dass im Gehirn keine Regeneration stattfinden kann [19]. Heutzutage ist jedoch klar, dass das Gehirn ein dynamisches System ist, in welchem eine sehr hohe Plastizität vorliegt [16]. Diese besteht zum einen aus der synaptischen Plastizität und zum anderen aus der strukturellen Plastizität [16]. Bei der synaptischen Plastizität verändern sich bereits bestehende Synapsen [189]. Die strukturelle Plastizität beschreibt die Bildung neuer Nervenzellen aus neuronalen Stammzellen in zwei Regionen des Gehirns beim Menschen, dem Bulbus olfactorius und dem Gyrus dentatus, welcher ein Teil des Hippocampus ist [7, 16, 190]. Bei neuronalen Stammzellen handelt es sich um multipotente Zellen, die sich unbegrenzt teilen oder radiale Gliazellen bilden können [16, 191]. Diese radialen Gliazellen können zu Ependymzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten oder Neuronen ausdifferenzieren [191, 192]. Die Bildung der Neuronen geht meistens mit einem Proliferationsstopp der neuronalen, undifferenzierten Stammzellen einher [193]. Die anschließende Bildung der Neuronen kann in drei Schritte unterteilt werden, wobei es sich um die Proliferation, die neuronale Determination und die Reifung der Neuronen handelt [16]. Die entstandenen neuronalen Vorläuferzellen besitzen eine hohe Teilungsrate, welche jedoch nur wenige Tage anhält [16]. Sowohl die neuronalen Stammzellen als auch die neuronalen Vorläuferzellen exprimieren Nestin, die neuronalen Vorläuferzellen exprimieren jedoch kein saures Gliafaserprotein (GFAP) mehr, wodurch unterschieden werden kann, welche Zellen vorliegen [16]. Neuronale Vorläuferzellen exprimieren bereits AMPA, NMDA und GABA_A-Rezeptoren, aber auch neuronale Proteine wie beispielsweise Doublecortin (DCX) [16]. Der letzte Schritt, die Reifung der jungen Neuronen, findet über einen Zeitraum von etwa vier Wochen statt [16]. Während dieser Zeit wird weiterhin DCX exprimiert [16]. Außerdem werden neue Proteine, wie BDNF, Reelin und CREB exprimiert [191]. Die wenigen überlebenden, neugebildeten Neuronen werden dann in die neuronalen Netzwerke eingeschlossen [191]. Es wird davon ausgegangen, dass auch im menschlichen Hippocampus die adulte Neurogenese ein Leben lang stattfindet und mit steigendem Alter nur etwas weniger neue Nervenzellen gebildet werden [194]. Neuronen fungieren im Gehirn somit als funktionelle und strukturelle Einheit [9].

Die Entstehung von neuen Nervenzellen während der adulten Neurogenese ist durch viele Faktoren beeinflusst. Beispielsweise spielen Hormone bei der Entstehung neuer Nervenzellen eine große Rolle [191]. Einen positiven Einfluss haben dabei die Geschlechtshormone Östrogen und Testosteron, wohingegen Stresshormone, wie beispielsweise Cortisol, die adulte Neurogenese inhibieren [191]. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass epigenetische Veränderungen einen Einfluss auf die Neurogenese haben [191]. Beispielsweise hat eine Veränderung der Histonacetylierung und der Methylierung der DNA einen Einfluss auf die BDNF

Exprimierung, welches in der Reifung der jungen Neuronen eine Rolle spielt [191]. Auch Astrozyten spielen bei der Neurogenese eine entscheidende Rolle, da sie das Level verschiedener Moleküle durch Exozytose oder deren Aufnahme steuern [191]. Auch extrinsische Faktoren beeinflussen die Neurogenese [191]. Stress beispielsweise inhibiert die adulte Neurogenese, wohingegen sich Reize positiv auf die adulte Neurogenese auswirken [19]. Um im Folgenden die Neurogenese untersuchen zu können, wurde ein dualer Luciferase-Assay angewendet.

Der Luciferase-Assay

Die differenzierungsauslösende Aktivität der Extrakte und Reinsubstanzen wurde mittels eines dualen Luciferase-Reporterproteinassay am Institut für Experimentelle Neuroregeneration (Prof. Dr. Sébastien Couillard-Després) an der Paracelsus-Medizinischen Privatuniversität Salzburg unter Anleitung von Dr. Lara Bieler und zur Erzielung größerer Sicherheit meist nochmals durch diese bestimmt.

Zur Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (DIA) wurden Vorderhirnzellen der embryonalen Maus verwendet. Durch die Transfektion der Zellen mit zwei Luciferasen ist die DIA durch Messung der Biolumineszenz bestimmbar. Bei den Luciferasen handelt es sich zum einen um eine Luciferase aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) und zum anderen um eine Luciferase aus dem Seeschwamm (*Renilla reniformis*). Beide Luciferasen haben jeweils spezifische Substrate, hierbei handelt es sich um Luciferin und Coelenterazin. Durch die Luciferase aus dem Glühwürmchen wird die Gesamtdifferenzierungsaktivität bestimmt, welche durch das Markerprotein Doublecortin (DCX) ausgelöst wird. Wie bereits beschrieben, wird Doublecortin ab der neuronalen Determination bei der Bildung neuer Neuronen exprimiert. Die Gesamtdifferenzierungsaktivität wird normiert auf die Zellzahl, welche durch die Aktivität der Luciferase aus dem Seeschwamm gemessen wird. Die gemessene Renilla Aktivität ist ein Maß für die transfizierten Zellen und dient als Kontrolle. Hierdurch werden die erhaltenen Werte der Luciferase Aktivität in direkten Bezug zur Zellzahl gesetzt.

Durch die Berechnung der normierten Luciferase Aktivität (NLA) kann eine auf die Zellzahl normierte Aktivität bestimmt werden.

$$NLA = \frac{\text{Photinus – Aktivität (Substanz)}}{\text{Renilla – Aktivität (Substanz)}}$$

Um die Renilla Aktivitäten vergleichen zu können, ist die Berechnung der normierten Renilla Aktivität (NRA) nötig. Diese kann als Maß der überlebenden Zellen verwendet werden.

$$NRA = \frac{\text{Renilla – Aktivität (Substanz)}}{\text{Renilla – Aktivität (Kontrolle)}}$$

Die Vergleichbarkeit der Werte aus den biologischen Triplikaten ist durch die Berechnung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (DIA) gegeben.

$$DIA = \frac{NLA (Substanz)}{NLA (Kontrolle)}$$

Ein Gemisch aus Retinsäure (10 µM) und Valproinsäure (50 µM), welche die Differenzierung auslösen, wurde als Positivkontrolle verwendet. Alle Assays wurden jeweils in biologischen Triplikaten oder Quadruplikaten und technischen Quadruplikaten durchgeführt. Ausreißer wurden mit dem Grubbs Ausreißer Test bestimmt und die Signifikanz mit dem T-Test (** p < 0,01, *p < 0,05).

5.1 Ergebnisse und Diskussion

5.1.1 Differenzierungsinduzierende Aktivität des Rohextraktes und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Extrakte aus *Bacopa monnieri*

Um eine Übersicht der differenzierungsinduzierenden Aktivität des Rohextraktes und der verschiedenen Fraktionen gewonnen durch Flüssig-Flüssig-Extraktion zu bekommen, wurden alle gewonnenen Extrakte mit Hilfe des Luciferase-Assays untersucht.

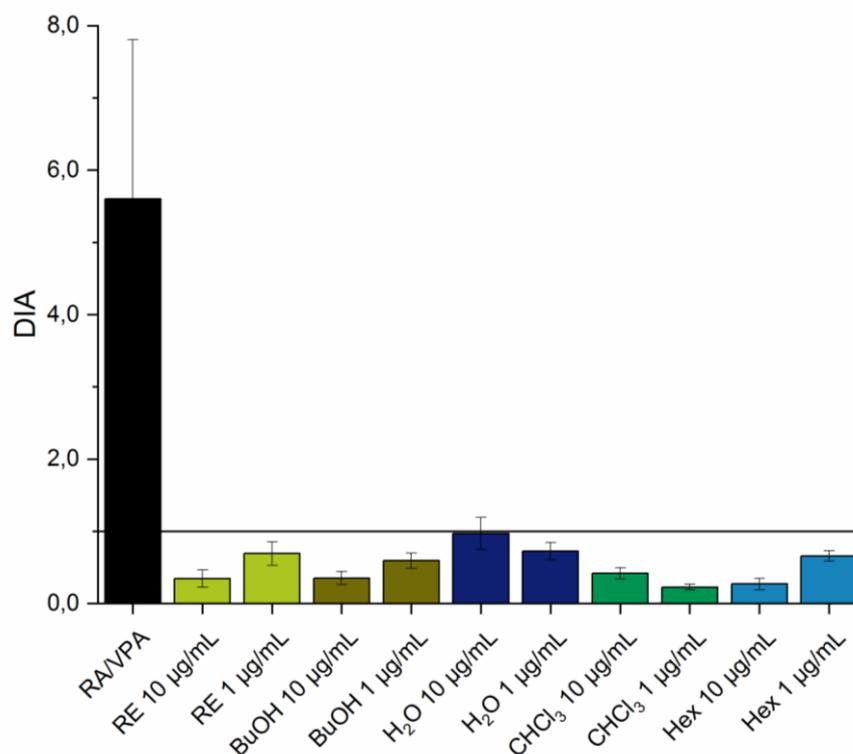


Abbildung 30: Differenzierungsinduzierende Aktivität des Rohextraktes (RE) und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1) in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL.

Abbildung 30 zeigt, dass weder der Rohextrakt noch weitere gewonnene Fraktionen eine differenzierungsinduzierende Aktivität aufwiesen. Selbst im Vergleich mit dem unbehandelten Vehikel waren alle Fraktionen unter diesem Wert oder gleichauf mit diesem (H_2O , $10 \mu\text{g/mL}$). Die differenzierungsinduzierende Aktivität des gewonnenen Wasserextrakts ($10 \mu\text{g/mL}$) war deutlich höher als diese der anderen Fraktionen. Dies war mitunter den weniger überlebenden Zellen geschuldet, was im Folgenden durch die normierte Renilla Aktivität dargestellt ist (Abbildung 31).

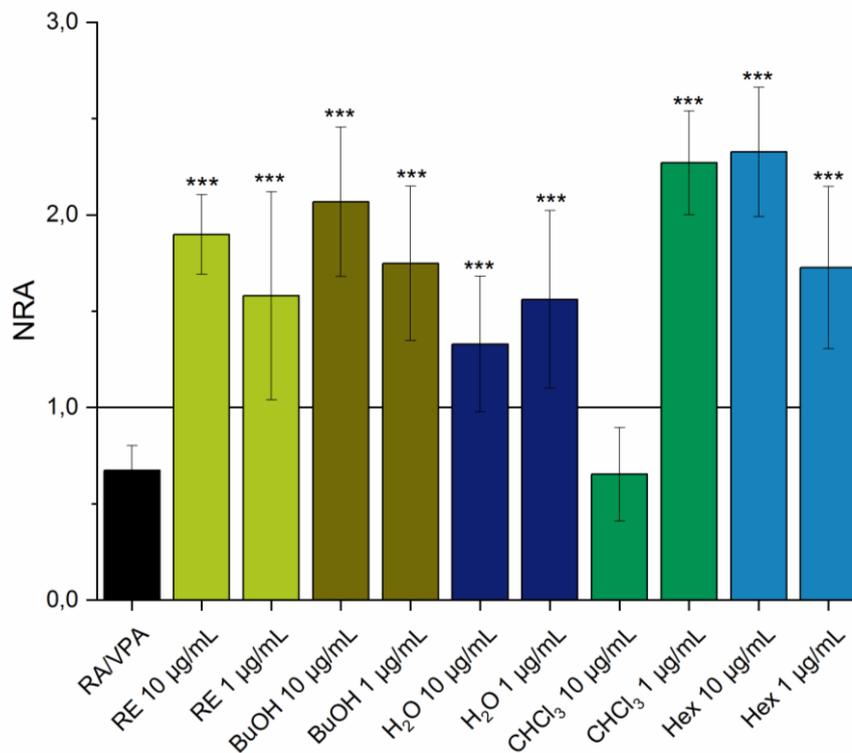


Abbildung 31: Normierte Renilla Aktivität des Rohextraktes (RE) und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$) in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$. Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.

Die in Abbildung 31 dargestellten normierten Renilla Aktivitäten zeigen, dass alle *B. monnieri* Extrakte außer der gewonnene Chloroformextrakt ($10 \mu\text{g/mL}$) signifikant ($p < 0,001$) höhere Werte der gemessenen Zellzahlen aufwiesen verglichen mit der Positivkontrolle (RA/VPA). Dadurch konnte eine Toxizität der getesteten Konzentrationen ($1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$) auf den embryonalen Vorderhirnzellen ausgeschlossen werden. Eine Testung aller Extrakte in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/mL}$ zeigte, dass in dieser Konzentration alle Extrakte außer dem Wasserextrakt toxisch auf die Zellen wirkten. Der Wasserextrakt zeigte jedoch auch in sehr hohen Konzentrationen keine starke differenzierungsinduzierende Aktivität, was dafürspricht, dass in dieser Fraktion keine interessanten Inhaltsstoffe enthalten sind. Die niedrigeren Werte der NRA für den Wasserextrakt führen außerdem zu den leicht erhöhten Werten bei der DIA. Die allgemeine sehr niedrige Toxizität der Extrakte spricht für die neuroprotektiven Kapazitäten des BME, welche vielfach untersucht wurden.

Da keiner der untersuchten Extrakte eine erhöhte Aktivität bezüglich der Differenzierung aufwies, wurde sich im Folgenden auf die durch Festphasenextraktion erhaltenen Extrakte konzentriert, da hier eine weitere Anreicherung der Bacoside erzielt wurde und diese vielfach als aktive Substanzen in *B. monnieri* beschrieben sind.

5.1.2 Differenzierungsinduzierende Aktivität der durch Festphasen-Extraktion erhaltenen Extrakte aus *Bacopa monnieri*

Durch die weitere Fraktionierung des Butanolextraktes mittels Festphasenextraktion wurde Bacosid A im Festphasenextrakt (60/40) und Luteolin im Festphasenextrakt (70/30) wie bereits beschrieben angereichert, was eine erneute Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität erforderte (Abbildung 32).

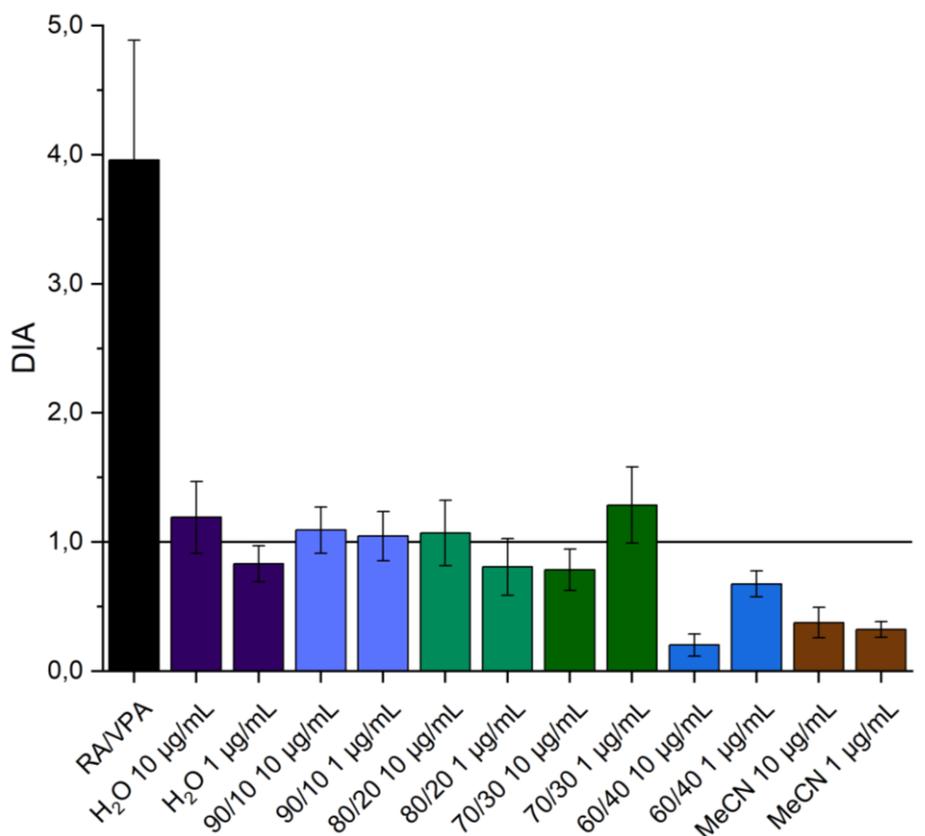


Abbildung 32: Differenzierungsinduzierende Aktivität der durch Festphasenextraktion gewonnenen Extrakte des Butanolextrakts aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($\gamma = 1$) in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL.

Die Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität zeigt, dass keine der untersuchten Fraktionen eine deutliche Differenzierungsinduktion aufwies. Die beiden am Ende der Festphasenextraktion durch den steigenden Gehalt an Acetonitril gewonnenen Extrakte (60/40 und MeCN) zeigten gar keine Aktivität, wohingegen eine leichte Aktivität bei der SPE Fraktion

(70/30) in der kleinen Konzentration (1 µg/mL) festgestellt werden konnte. Auch die Wasserfraktion in hoher Konzentration (10 µg/mL) zeigte eine leichte Aktivität. Beide Aktivitäten können auch auf die reduzierte Zellzahl durch die gemessene Renilla Aktivität (Abbildung 33) zurückgeführt werden.

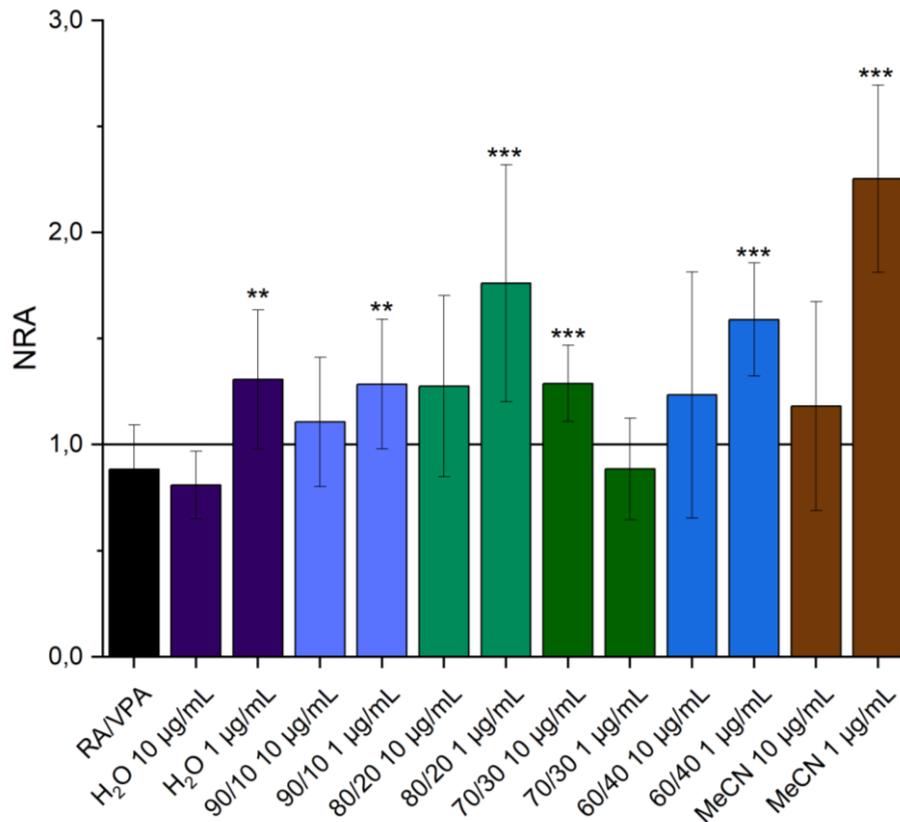


Abbildung 33: Normierte Renilla Aktivität der durch Festphasenextraktion gewonnenen Extrakte des Butanolextrakts aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$) in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL. Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.

Abbildung 33 zeigt, dass keiner der mittels Festphasenextraktion erhaltenen Extrakte in den getesteten Konzentrationen (10 µg/mL und 1 µg/mL) deutlich toxischer auf die Zellen wirkte als die Positivkontrolle. Bis auf den Festphasenextrakt (70/30) zeigten alle Extrakte in der getesteten kleinen Konzentration signifikant höhere Zellzahlen als die Positivkontrolle. Hervorzuheben ist der Festphasenextrakt (MeCN), der vorwiegend Betulinsäure enthält. Dieser Extrakt hatte eine deutlich signifikante ($p < 0,001$) Wirkung auf die Zellzahl und scheint proliferierend zu wirken.

Da der Gehalt an Luteolin mit 0,035 mg Luteolin pro mg Festphasenextrakt (70/30) bestimmt wurde, wurde die Aktivität des reinen Luteolins in der enthaltenen Menge mit dem Festphasenextrakt in der Konzentration von 1 µg/mL verglichen.

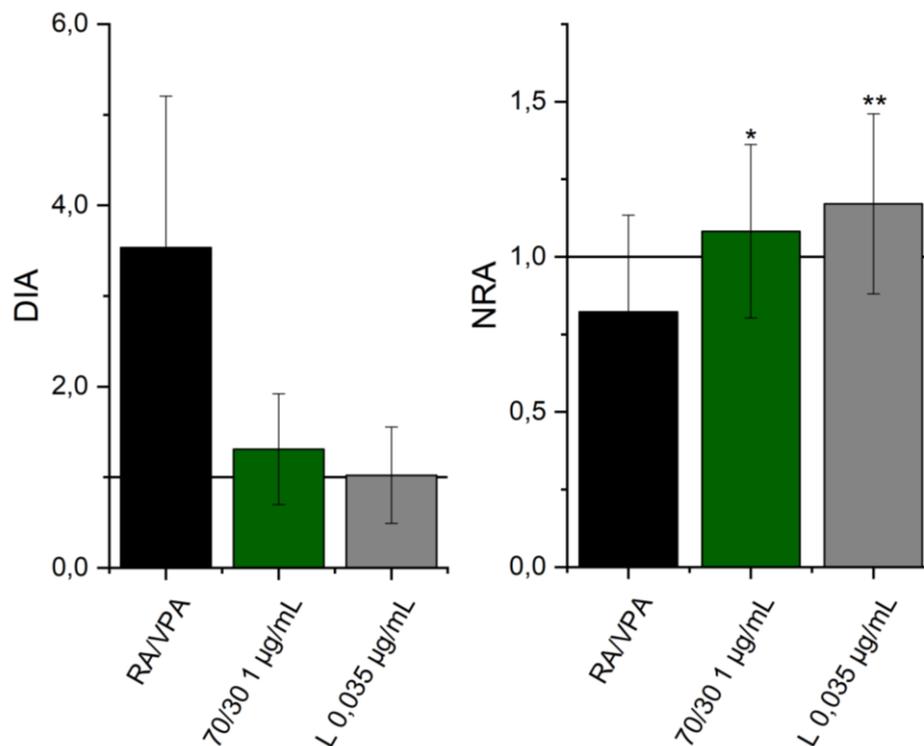


Abbildung 34: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität des Festphasenextraktes (70/30) (1 µg/mL) und des Luteolins (L) in der im Festphasenextrakt (70/30) enthaltenen Konzentration (0,035 µg/mL) (links) und der normierten Renilla Aktivität (rechts) unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RAVVA.

Abbildung 34 zeigt, dass die differenzierungsinduzierende Aktivität des Luteolins in der Konzentration von 0,035 µg/mL, in der es im Festphasenextrakt enthalten ist, leicht geringer war als die des Extrakts. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass die normierte Renilla Aktivität bei der Zugabe des reinen Luteolins leicht höher war als die des Festphasenextrakts und zum anderen ist davon auszugehen, dass beim Extrakt ein Zusammenspiel durch synergistische Effekte mit anderen enthaltenen Inhaltsstoffen dafür zuständig war, dass die differenzierungsinduzierende Aktivität leicht erhöht war. Dieser Versuch zeigte jedoch, dass davon auszugehen ist, dass ein Großteil der Aktivität dieses Extraktes dem darin enthaltenen Luteolin zuzuschreiben ist.

Bewertung

Aufgrund der Vielzahl an neuropharmakologischen Studien zu *B. monnieri* ist es naheliegend, die Pflanze und verschiedene Extrakte dieser auf die Neurogenese zu untersuchen. Die Literatur zur Untersuchung von *B. monnieri* in Bezug auf adulte Neurogenese ist jedoch bisher nicht sehr vielfältig.

Kumar und Mondal untersuchten die Wirkung von *B. monnieri* im Jahr 2016 in Bezug auf die neuroprotektive, neurotrophe und antioxidative Fähigkeit bei Ratten in einem chronisch induzierten Stressmodell (CUS), welches einer Depression gleicht, nach 35 Tagen [31]. Dabei wurde lebenden Ratten *B. monnieri* verabreicht. Am Ende der Studie wurden diese getötet und anschließend wurden deren Gehirne untersucht. Hierbei wurden unter anderem die Expression von BDNF und DCX im Hippocampus nach Einnahme des *B. monnieri* Extraktes (BME) (40-50 % Bacoside) untersucht und mit der Positivkontrolle Imipramin verglichen [31]. Hierbei handelt es sich um ein Antidepressiva [31]. Die Studie zeigte, dass bei Ratten, die den BME erhalten haben, die Level der Proteine (BDNF und DCX) nahezu gleich hoch waren, wie die der unbehandelten Kontrolle und im Vergleich immer signifikant ($p < 0,01$) unterschiedlich zu der gestressten Kontrolle [31]. Beide Proteinlevel waren jedoch durch die Gabe des Extraktes nie höher als die unbehandelte Kontrolle und in etwa gleich mit Imipramin [31]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Zahl der NeuN-positiven Zellen, ein Markerprotein zur Detektion von Neuronen, im Hippocampus bei den chronisch gestressten Ratten durch die Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,01$) höher war als die der behandelten Ratten. Die unbehandelte Kontrolle zählte jedoch die meisten NeuN-positiven Zellen und die mit der Positivkontrolle behandelten Ratten zeigten leicht mehr Zellen als die mit dem Extrakt behandelten Ratten [31]. Da Imipramin jedoch in einer Konzentration von 20 mg/kg und der BME in einer Konzentration von 80 mg/kg auf den Ratten untersucht wurden, können die Ergebnisse anhand der höheren Konzentration des Extraktes nur bedingt miteinander verglichen werden [31]. Die Studie zeigt jedoch, dass der chronische Stress die Vermehrung von Vorläuferzellen im Hippocampus und somit die Neurogenese unterdrückt hat, was durch die Gabe von *B. monnieri* bzw. der Positivkontrolle nahezu vollständig verhindert wurde [31]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu *B. monnieri* in Bezug auf die DCX Expression wurden in einem Assay mit embryonalen kultivierten Vorderhirnzellen der Maus gemacht. Da Kumar und Mondal Ratten mit dem Extrakt behandelten, ist die Vergleichbarkeit bereits durch die unterschiedlichen Tierarten gesenkt. Weiterhin ist der in dieser Arbeit angewendete, duale Luciferase-Assay ein Reporterproteinassay. Hierbei wurden transfizierte Zellen verwendet. Da Kumar und Mondal die Ratten sezieren, den Hippocampus gewonnen haben und anschließend die Proteinlevel im Hippocampus untersuchten, ist dadurch die Vergleichbarkeit weiterhin verringert. Auch untersuchten Kumar und Mondal gestresste Tiere, wohingegen im verwendeten Assay kein Stress auf die Zellen ausgeübt wurde. Eine positive Wirkung des Extraktes auf gestresste Zellen kann über andere Wirkmechanismen stattfinden. Durch Stress steigt beispielsweise das Hydrocortison-Level, welches in der Nebennierenrinde gebildet wird. Dadurch sinkt das DCX Level nachweislich [195]. Möglicherweise hat der *B. monnieri* Extrakt in der Untersuchung von Kumar und Mondal so gewirkt, dass die Ratten weniger gestresst werden, wodurch weniger Hydrocortison ausgeschüttet wurde und somit das DCX Level dem von nicht gestressten Ratten entsprach.

In einer weiteren Studie von Kwon et al. aus dem Jahr 2018 wurde die Gabe eines *B. monnieri* Extraktes (200 mg/kg) auf männliche, acht Wochen alte Mäuse untersucht [196]. Die Mäuse wurden über vier Wochen mit dem Extrakt gefüttert, wobei keine Angabe über den Gehalt an Bacosiden oder anderen Inhaltsstoffen in der Studie gemacht wurde [196]. Anschließend fand eine immunohistochemische Färbung für die Proteine Ki67, DCX und pCREB statt [196]. Außerdem wurde die Expressierung von BDNF untersucht [196]. Das Protein Ki67, welches ein Maß für die Proliferation ist, war durch die Gabe des Extraktes signifikant ($p < 0,05$) erhöht [196]. Außerdem war die Anzahl der DCX-positiven Neuroblasten im Gyrus dentatus durch die Gabe des Extraktes signifikant ($p < 0,05$) gesteigert [196]. Weiterhin war auch phosphoryliertes CREB durch die Gabe des Extraktes signifikant ($p < 0,05$) erhöht, was zur Expressierung von neurotrophen Genen führt [196]. Die Expressierung von BDNF als eines dieser neurotrophen Gene war durch den Extrakt auch signifikant erhöht ($p < 0,05$) [196]. Auch der Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit dieser Studie ist schwierig, da bei dieser Untersuchung wiederum die Proteinlevel direkt im Gyrus dentatus bestimmt worden sind, wohingegen das verwendete Assayprinzip mit transfizierten Zellen arbeitet. Weiterhin ist an dieser Studie zu kritisieren, dass kein Gehalt der verschiedenen Inhaltsstoffe in *B. monnieri* angegeben wurde, wodurch kein Rückschluss darauf gezogen werden kann, was der Auslöser der Neurogenese war. Als weiterer Kritikpunkt ist anzuführen, dass keine Positivkontrolle verwendet wurde. Teilweise zeigten die Extrakte in den dargestellten Untersuchungen des dualen Luciferase-Assays eine leichte differenzierungsinduzierende Aktivität, verglichen mit der Positivkontrolle sind diese Effekte jedoch zu vernachlässigen. Vergleicht man das Ergebnis des Proteins Ki67 mit den erhaltenen Ergebnissen, kann gesagt werden, dass in beiden Fällen die Zellen weiterhin proliferierten.

Eine weitere Studie von Pham et al. zur Untersuchung der Neurogenese in jugendlichen Mäusen aus dem Jahr 2020 zeigt, dass die Einnahme des Extraktes (Bacosidgehalt $> 30\%$, 50 mg/kg) die Neurogenese im Hippocampus anregte [157]. In erwachsenen Mäusen wurde jedoch die Neurogenese nicht angeregt [157]. Die Gabe des Extraktes erfolgte über eine Woche, anschließend erfolgte die immunohistochemische Auswertung über BrdU-positive Zellen [157]. Die Auswertung zeigt, dass die Anzahl der BrdU-positiven Zellen im Gyrus dentatus durch die Einnahme des Extraktes signifikant ($p < 0,05$) erhöht war, jedoch war auch der Zelltod im Hippocampus gesteigert [157]. Hier liegt jedoch keine Signifikanz vor [157]. Außerdem wurde nach vier Wochen die Anzahl der NeuN-positiven Zellen untersucht, welche durch die Einnahme des Extraktes signifikant erhöht war gegenüber der Kontrolle [157]. Der direkte Vergleich dieser Ergebnisse mit den Untersuchungen des dualen Reporterproteinassays ist schwierig, da Pham et al. wiederum direkt die Anzahl der Zellen im Hippocampus untersuchten. Kritisch zu sehen ist jedoch, dass hier auch keine Positivkontrolle verwendet wurde und somit keine Einordnung stattfinden kann, ob die erhaltenen Werte Relevanz bei der Neurogenese haben.

Weiterhin gilt für die Untersuchung von Extrakten, dass es grundsätzlich sehr schwierig ist, eine derartig komplexe Mischung von Inhaltsstoffen zu untersuchen, da möglicherweise auch synergistische Effekte auftreten. Außerdem ist es auch möglich, dass Inhaltsstoffe nur in sehr kleinen Konzentrationen vorliegen und deswegen bei einem Screening keine Beachtung finden. Folglich müssten alle Inhaltsstoffe in *B. monnieri* einzeln auf ihre Aktivität untersucht werden.

5.1.3 Differenzierungsinduzierende Aktivität der Reinsubstanzen in *Bacopa monnieri*

Nachdem die fünf Referenzsubstanzen Betulinsäure, Bacosid A, Luteolin-7-glucosid, Luteolin und Apigenin eindeutig in *B. monnieri* identifiziert worden sind, wurden die einzelnen Substanzen auf ihre differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht.

Betulinsäure

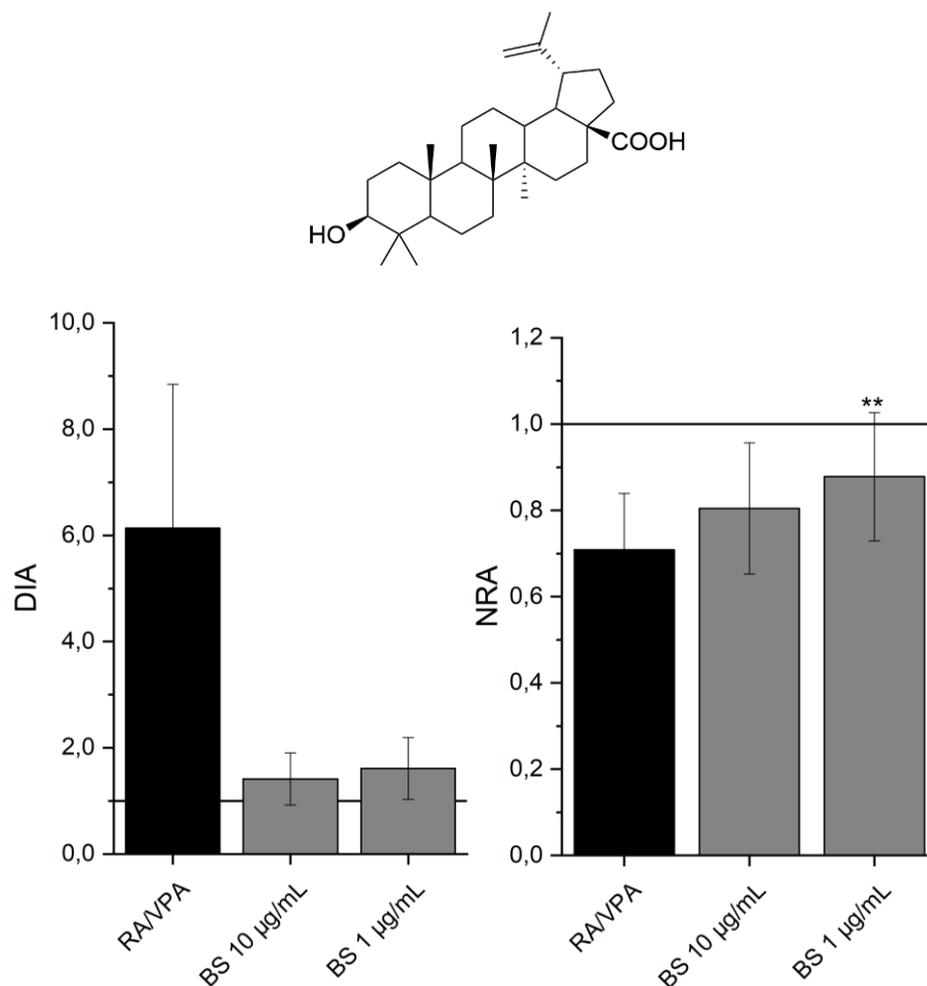


Abbildung 35: Oberer Abschnitt: Darstellung der Betulinsäure. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (links) und der normierten Renilla Aktivität (rechts) von Betulinsäure in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RAVPA.

Abbildung 35 zeigt, dass die Betulinsäure nur eine sehr geringe differenzierungsinduzierende Aktivität auf die embryonalen Vorderhirnzellen der Maus zeigte. Dabei war die Aktivität der niedrigen Konzentration (1 µg/mL) höher als die der höheren Konzentration. Außerdem war die durch die normierte Renilla Aktivität gemessene Zellzahl durch die Betulinsäure in der niedrigeren Konzentration signifikant höher als die der Positivkontrolle.

Bewertung - Betulinsäure

In einer Studie von Kaundal et al. von 2018 wurde das Potential der Betulinsäure bei einem Verschluss der Kopfschlagader in Ratten als Schlaganfallmodell untersucht [197]. Sieben Tage nach dem Verschluss der Kopfschlagader wurden die Ratten über drei Wochen mit Betulinsäure (10 mg/kg und 15 mg/kg) behandelt [197]. Durch den Verschluss der Kopfschlagader wurden das cAMP, das cGMP, das BDNF, das Serotonin, das Norephrin und das Dopamin-Level signifikant gesenkt. Durch die Einnahme der Betulinsäure waren alle Level wieder signifikant gesteigert [197]. Dabei zeigte die Betulinsäure genauso gute Effekte wie die Positivkontrolle Donepezil [197]. Kaundal et al. haben durch die Darstellung der neuroprotektiven Effekte der Betulinsäure Hoffnung darauf gegeben, dass die Betulinsäure auch in der Neurogenese Potential besitzt. BDNF, ein wichtiges Molekül in der Neurogenese, wurde durch die Einnahme der Betulinsäure gesteigert. Starke Auswirkungen auf die adulte Neurogenese konnten jedoch in den durchgeführten Versuchen im dualen Reporterproteinassay nicht gezeigt werden. Es ist jedoch schwierig, zwei unterschiedliche Tierarten (Ratten und Mäuse) zu vergleichen. Weiterhin wurden hier die Ratten durch den Verschluss der Kopfschlagader stark beeinflusst, wohingegen die verwendete Zellkultur der embryonalen Vorderhirnzellen nicht beeinflusst wurden.

In weiteren Studien zu verschiedenen Zelllinien hat die Betulinsäure bereits differenzierendes Potential gezeigt. Galgon et al. haben in einer Studie von 2005 bewiesen, dass Betulinsäure differenzierend auf Keratinozyten gewirkt hat [198]. Dabei löst die Betulinsäure die Differenzierung der Keratinozyten in Korneozyten aus [198]. Der festgestellte IC₅₀ für Keratinozyten lag bei etwa 5 µg/mL [198]. Der bestimmte IC₅₀ Wert für die Keratinozyten zeigt, dass eine Vergleichbarkeit hier nur schwer gegeben ist, da bei den embryonalen Vorderhirnzellen selbst die hohe Konzentration von 10 µg/mL keine Toxizität aufwies. Da sowohl Keratinozyten als auch neuronale Stammzellen aus dem ektodermalen Keimblatt gebildet werden [199], ist es umso interessanter, dass die Betulinsäure zwar in Keratinozyten die Differenzierung ausgelöst hat, im Screening Versuch zur Neurogenese jedoch keine Aktivität nachweisbar war.

Weiterhin haben Lo et al. im Jahr 2010 festgestellt, dass Betulinsäure einen Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten zeigte [200]. Dabei wurde die Expressierung der alkalischen Phosphatase und die Mineralisierung des knochenartigen Gewebes untersucht [200]. Beides war durch die Gabe von mindestens 5 µM signifikant gesteigert [200]. Dabei zeigten Lo et al.

auch, dass die Exprimierung von RUNX2, einem essentiellen Protein zur Differenzierung der Osteoblasten gesteigert war [200]. Da RUNX2 auch an der Entwicklung von GABAergen Neuronen im Hippocampus beteiligt ist [201], ist ein Bezug zur Neurogenese durchaus gegeben.

Bacosid A

Um ausschließen zu können, dass die Fraktion, welche die angereicherten Bacoside enthält, durch etwas verunreinigt ist, was möglicherweise die Differenzierung hemmt, wurde Bacosid A als Reinsubstanz in Bezug auf die differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht. Im Folgenden wird die Aktivität von Bacosid A auf die embryonalen Vorderhirnzellen diskutiert.

Abbildung 36 zeigt, dass auch reines Bacosid A ohne weitere mögliche Verunreinigungen genau wie der erhaltenene Festphasenextrakt (60/40) keine differenzierungsinduzierende Aktivität zeigte. Desweiteren zeigte Bacosid A auch keine deutlich erhöhten Renilla Werte. Zwar lag der Wert der getesteten kleinen Konzentration (1 µg/mL) von Bacosid A signifikant über dem Wert der Positivkontrolle, jedoch nicht über dem Wert des Vehikels. Eine höhere Konzentration von Bacosid A (100 µg/mL) war toxisch auf die embryonalen Vorderhirnzellen der Maus, wohingegen sehr kleine Konzentrationen (0,1 µg/mL) keinen Effekt auf die Zellen zeigten (Daten sind nicht dargestellt).

Bewertung - Bacosid A

In einer Untersuchung von Malishev et al. wurde gezeigt, dass Bacosid A (20 µM) eine neuroprotektive Wirkung auf die β-Amyloid Zytotoxizität in humanen Neuroblastomzellen zeigt [202]. Außerdem hemmte die Gabe von Bacosid A die Fibrillierung ausgelöst durch das β-Amyloid [202]. Somit konnten Malishev et al. eine mögliche direkte Anwendung von Bacosid A gegen Alzheimer finden, eine differenzierungsauslösende Aktivität von Bacosid A als spätere Behandlung für geschädigte Neuronen durch Bacosid A konnte jedoch durch den dualen Reporterproteinassay nicht nachgewiesen werden.

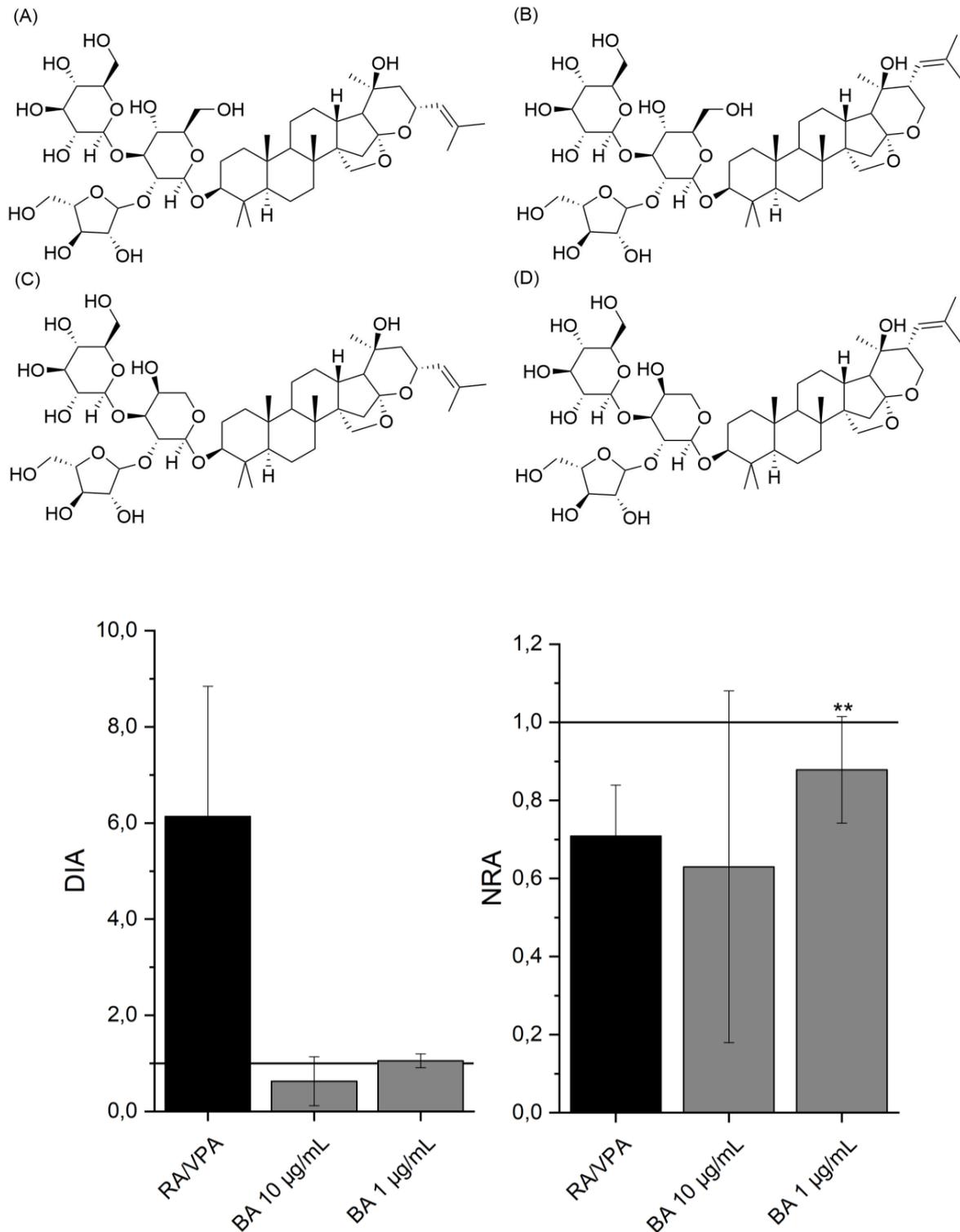


Abbildung 36: Oberer Abschnitt: Darstellung der in Bacosid A enthaltenen einzelnen Substanzen als Strukturen: Bacosid A3 (A), Bacopasid II (B), Bacopasid X (C) und Bacopasaponin C (D). Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (links) und der normierten Renilla Aktivität (rechts) von Bacosid A in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RAVVPA.

Da Saponine aufgrund ihrer amphiphilen Struktur weiterhin eine interessante Substanzklasse in Bezug auf die Neurogenese sind, wäre künftig eine Untersuchung der Saponine im Ginseng

eine vielversprechende Option. Dabei enthält der Ginseng genau wie Brahmi Saponine vom Dammarantyp. Die im Ginseng enthaltenen Saponine vom Dammarantyp sind die einzigen, welche in der Literatur als differenzierend beschrieben werden. In Untersuchungen des *Panax notoginseng* von He et al. aus dem Jahr 2015 wurde die Zahl der DCX-positiven Zellen nach einer Ischämie in Ratten untersucht [203]. Dabei zeigten die darin enthaltenen Saponine nach 14 Tagen eine signifikante Wirkung auf die Expressierung von DCX im Bulbus olfactorius [203]. In einer weiteren Studie von Si et al. aus dem Jahr 2016 wurde die Wirkung der Saponine des *Panax notoginseng* auf unbehandelte Ratten untersucht [204]. Hierbei wurden neuronale Stammzellen der Ratte mit den Saponinen behandelt und anschließend wurde die Nestin-Expressierung untersucht [204]. Dabei wurde gezeigt, dass durch die Saponine (15,4 µg/mL) die Zahl der Nestin-positiven Zellen deutlich gestiegen ist [204]. Weiterhin waren die GFAP-positiven Zellen und die BDNF-Expressierung durch die Saponine erhöht [204]. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Saponine eine differenzierende Wirkung auf neuronale Stammzellen in Neuronen und Gliazellen zeigen [204]. Da beide Studien keine Positivkontrolle verwenden, wäre eine Untersuchung dieser Dammaran-Typ Saponine des Ginsengs im verwendeten dualen Reporterproteinassay interessant, um die Wirkung der Saponine im Gegensatz zu der Positivkontrolle aus Retinsäure und Valproinsäure einschätzen zu können.

Apigenin, Luteolin, Luteolin-7-glucosid

Nachdem die höchste differenzierungsinduzierende Aktivität von *B. monnieri* im Festphasenextrakt (70/30) beobachtet werden konnte und diese nahezu vollständig dem Luteolin zugeschrieben werden konnte, wurde ein Vergleich von Luteolin mit weiteren in *B. monnieri* nachgewiesenen Flavonoiden in Bezug auf ihre differenzierungsinduzierende Aktivität gemacht. Neben Luteolin wurden Apigenin und Luteolin-7-glucosid untersucht.

Die in Abbildung 37 dargestellte differenzierungsinduzierende Aktivität zeigt, dass Apigenin (10 µg/mL) eine stärkere Aktivität als Luteolin und Luteolin-7-glucosid aufwies. Die leicht erhöhten Werte für sowohl Luteolin als auch Luteolin-7-glucosid bei der getesteten hohen Konzentration hängen mit der niedrigen gemessenen Renilla Aktivität und der damit verbundenen niedrigen Zellzahl zusammen (Abbildung 38). Somit war Apigenin das am potenziell stärksten differenzierungsinduzierende Flavonoid im *B. monnieri* Extrakt. Der Wert der normierten Firefly Aktivität von Apigenin lag dabei nahe dem Wert unserer verwendeten Positivkontrolle, wobei durch die leicht erhöhte Zellzahl im Gegensatz zur Positivkontrolle der Quotient und damit die differenzierungsinduzierende Aktivität leicht niedriger war als die der Positivkontrolle (Abbildung 37, Abbildung 38).

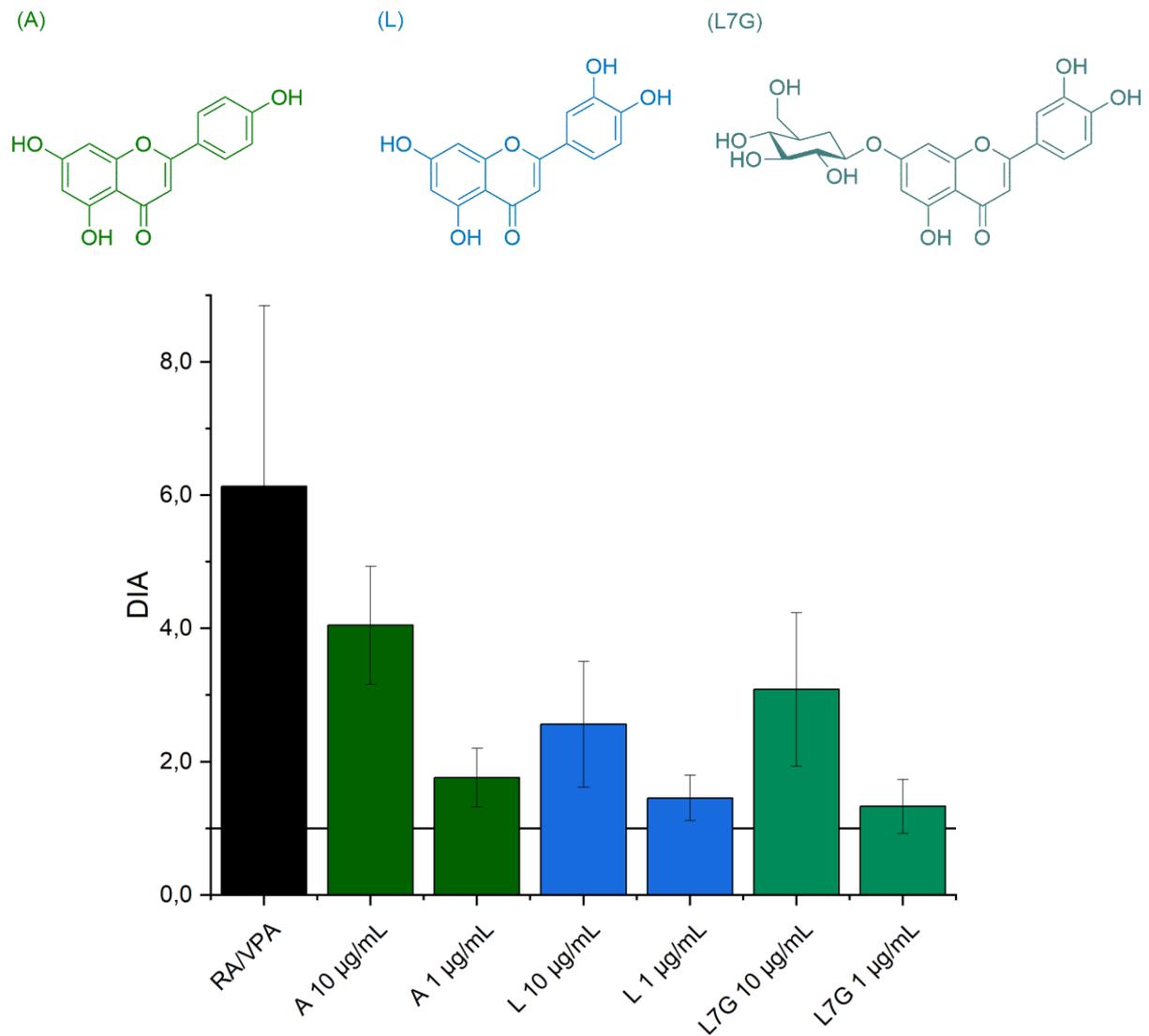


Abbildung 37: Oberer Abschnitt: Darstellung der Strukturen von Apigenin (A), Luteolin (L) und Luteolin-7-glucosid (L7G) nach dem nachfolgend verwendeten Farbschema. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Flavonoide in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL unter Einbeziehung des Vehikels ($\gamma = 1$).

Die normierte Renilla Aktivität zeigt, dass Apigenin nicht toxisch auf die embryonalen Vorderhirnzellen gewirkt hat, wohingegen Luteolin und Luteolin-7-glucosid in der getesteten hohen Konzentration (10 µg/mL) eine niedrige Renilla Aktivität und somit eine erhöhte Toxizität aufwiesen.

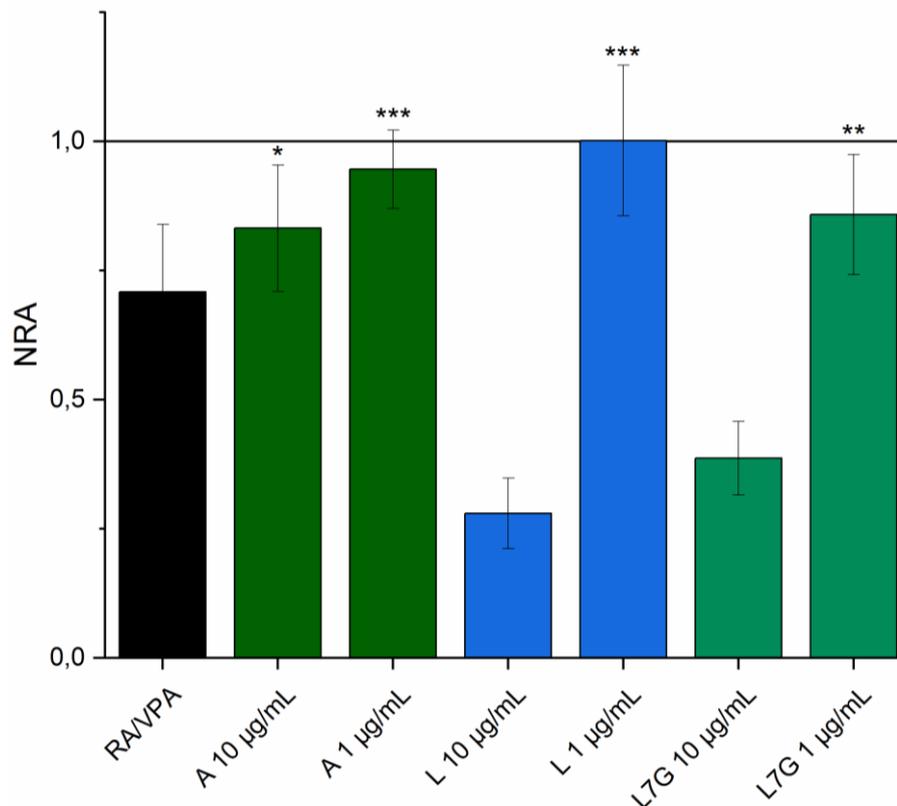


Abbildung 38: Darstellung der normierten Renilla Aktivität der Flavonoide Apigenin (A), Luteolin (L) und Luteolin-7-glucosid (L7G) in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.

Bewertung - Apigenin, Luteolin, Luteolin-7-glucosid

Bereits in früheren Untersuchungen am Lehrstuhl wurden (Prenyl-)flavonoide auf ihre differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht. Weiterhin besteht für Apigenin und Derivate davon seit 2008 ein Patent [205]. Zu diesen Derivaten zählen unter anderem auch Luteolin und Luteolin-7-glucosid, die beiden getesteten Substanzen [205]. Das Patent besagt, dass die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen und Stammzellen durch Apigenin in Mäusen angeregt wird [205]. Da im Patent explizit Apigenin erwähnt ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieses in den Experimenten für das Patent wie auch in den durchgeführten Experimenten zur Untersuchung der Inhaltsstoffe von *B. monnieri* die stärkste Aktivität zeigte. Weiterhin kann gesagt werden, dass möglicherweise durch das enthaltene Apigenin im Festphasenextrakt (70/30) die erhöhte Aktivität begründet werden kann, da Apigenin selbst in kleinen Konzentrationen eine leicht differenzierungsinduzierende Wirkung zeigte. Möglicherweise wirkten auch die beiden Substanzen Apigenin und Luteolin synergistisch in diesem Extrakt, wodurch die Differenzierung gesteigert wurde.

5.1.4 Differenzierungsinduzierende Aktivität von Indolalkaloiden

Im Folgenden wird die Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität von Indolalkaloiden, insbesondere von Thioindirubinen und 3,4-annelierten, peptidartigen Indolderivaten, dargestellt.

Thioindirubine

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei den Thioindirubinen um Farbstoffe. Die ausgeprägte Farbigkeit dieser Substanzen wird im Folgenden anhand der gemessenen Absorptionsspektren dargestellt.

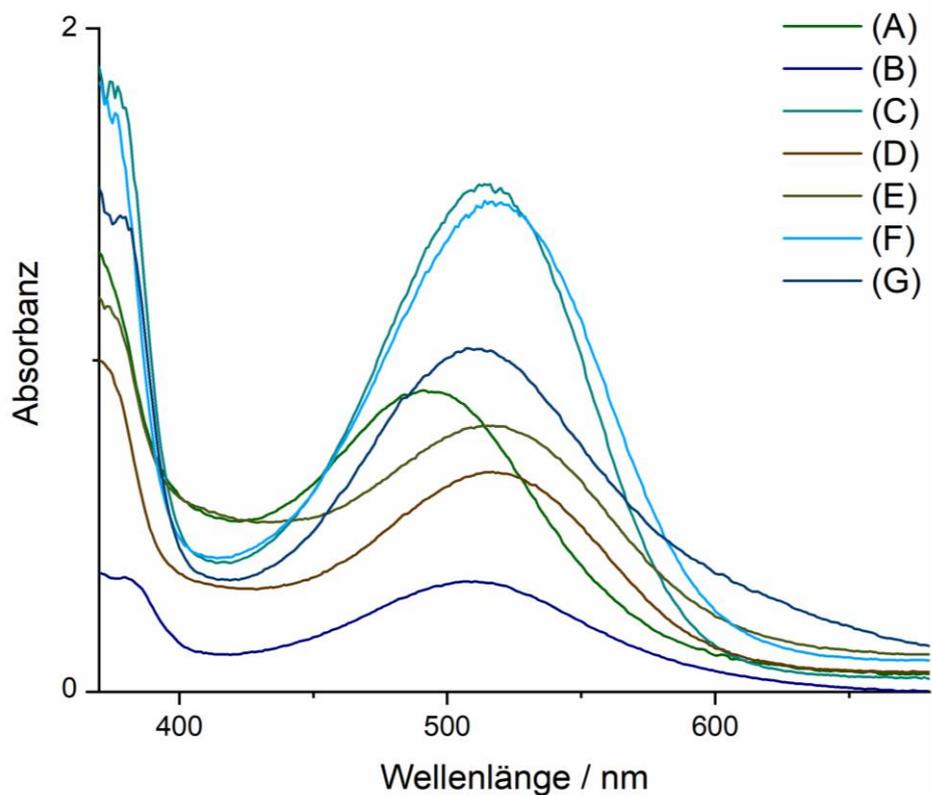


Abbildung 39: Darstellung der Absorptionsspektren von 5'-Thioindirubinessigsäure (A), 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methylthioindirubin (C), 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) im Bereich von 370-680 nm.

Abbildung 39 zeigt die Absorptionsspektren der synthetisch hergestellten Thioindirubine. Die Absorptionsmaxima ergaben für die einzelnen Substanzen folgende Werte:

- 5'-Thioindirubinessigsäure (A) 491 nm
- 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B) 507 nm
- 5'-Methylthioindirubin (C) 514 nm
- 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D) 517 nm

- 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E) 517 nm
- 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) 514 nm
- 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) 508 nm

Das Emissionsmaximum der Firefly Luciferase liegt im Bereich von 562-570 nm [206]. Die hohe Farbigkeit der Substanzen und das Emissionsmaximum der Firefly Luciferase könnten theoretisch bei der Messung der Biolumineszenz überlappen, jedoch sollte dies aufgrund der Messgegebenheiten keinen Einfluss haben. Bei der Messung der Lumineszenz im dualen Reporterproteinassay wurde die in DMSO gelöste Substanz mit Medium verdünnt und vor Zugabe des Luciferins abgenommen, wodurch eine Interferenz ausgeschlossen werden kann.

Abbildung 40 zeigt die differenzierungsinduzierende Aktivität der verschiedenen Thioindirubine, wobei 5'-Methylthioindirubin (C) in der hohen Konzentration (10 μM) die stärkste differenzierungsauslösende Wirkung aufwies. Auch in der kleinen getesteten Konzentration (1 μM) hatte das 5'-Methylthioindirubin (C) eine gute differenzierungsinduzierende Aktivität. Diese war jedoch durch die erhöhte Zellzahl gemessen durch die normierte Renilla Aktivität (Abbildung 41) geringer als die Positivkontrolle Retinsäure und Valproinsäure. Weiterhin zeigten die 5'-Thioindirubinessigsäure (A) und das 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D) eine leichte differenzierungsinduzierende Aktivität. Interessanterweise zeigte 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B) keine Aktivität. Dies kann zum einen damit begründet werden, dass das an Position 5' gebundene Chlor kleiner ist als beispielsweise die Carboxylgruppe der 5'-Thioindirubinessigsäure (A) oder die Methylgruppe des 5'-Methylthioindirubin (C). Andererseits kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der an Position 5' gebundenen Methylgruppe negativ auf die differenzierungsinduzierende Aktivität ist, da nahezu alle an der Position 5' substituierten Thioindirubine keine Aktivität zeigten, wenn die gesenkten Renilla Aktivitäten beachtet werden (5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F), 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G)). Weiterhin besaßen beide Konstitutionsisomere, die an Position 5' und 5'' durch eine Chlorgruppe und eine Methylgruppe substituiert sind, in etwa die gleich schwache differenzierungsinduzierende Aktivität. Die leichte Aktivität des 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D) kann damit begründet werden, dass Fluor als kleinster getesteter Substituent an Position 5' möglicherweise den geringsten Einfluss auf die differenzierungsinduzierende Aktivität hatte. Aus den Ergebnissen kann jedoch geschlossen werden, dass eine Substitution an Position 5' vorteilhaft für die differenzierungsinduzierende Aktivität ist. Um die Effekte von Substituenten an dieser Position einschätzen zu können, wäre eine Untersuchung einer Reihe von Thioindirubinen, welche unterschiedliche Substituenten besitzen, interessant. Dadurch könnten Einflüsse der Größe der Substituenten oder beispielsweise induktive oder mesomere Effekte abgeschätzt werden. Da die Methylgruppe einen positiven induktiven Effekt und die Carboxylgruppe einen negativen induktiven und einen negativen mesomeren Effekt auf das Elektronensystem haben, sind beide Gruppen schlecht vergleichbar. Ein Substituent an Position 5' ist nicht nötig und

kann eher als nachteilig in Bezug auf die differenzierungsinduzierende Aktivität angesehen werden. Eine Substitution mit Fluor oder anderen kleinen Gruppen scheint die beste Option.

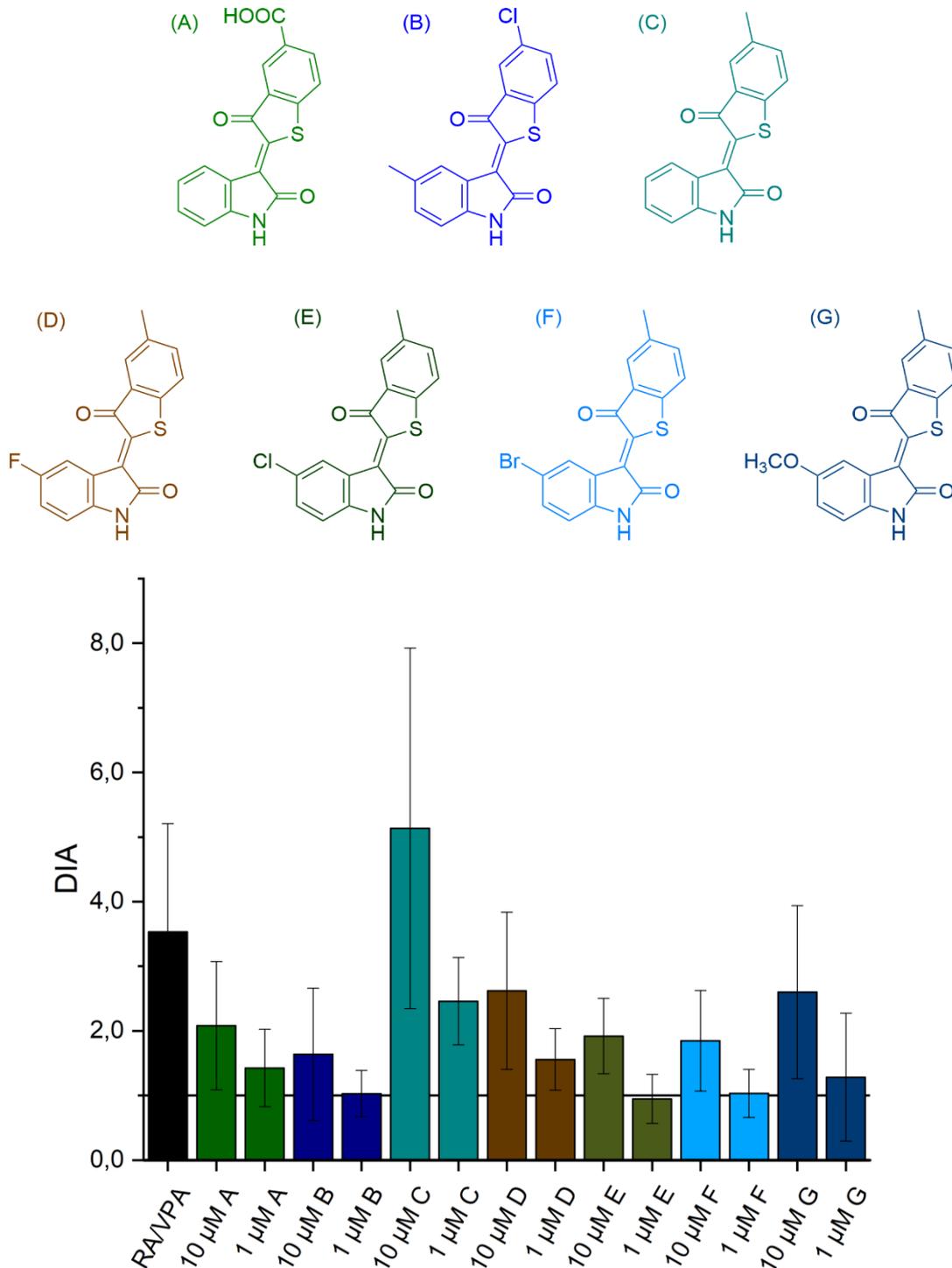


Abbildung 40: Oberer Abschnitt: Darstellung der Strukturen von 5'-Thioindirubinessigsäure (A), 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methylthioindirubin (C), 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) nach dem nachfolgend verwendeten Farbschema. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Thioindirubine in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels ($\gamma = 1$).

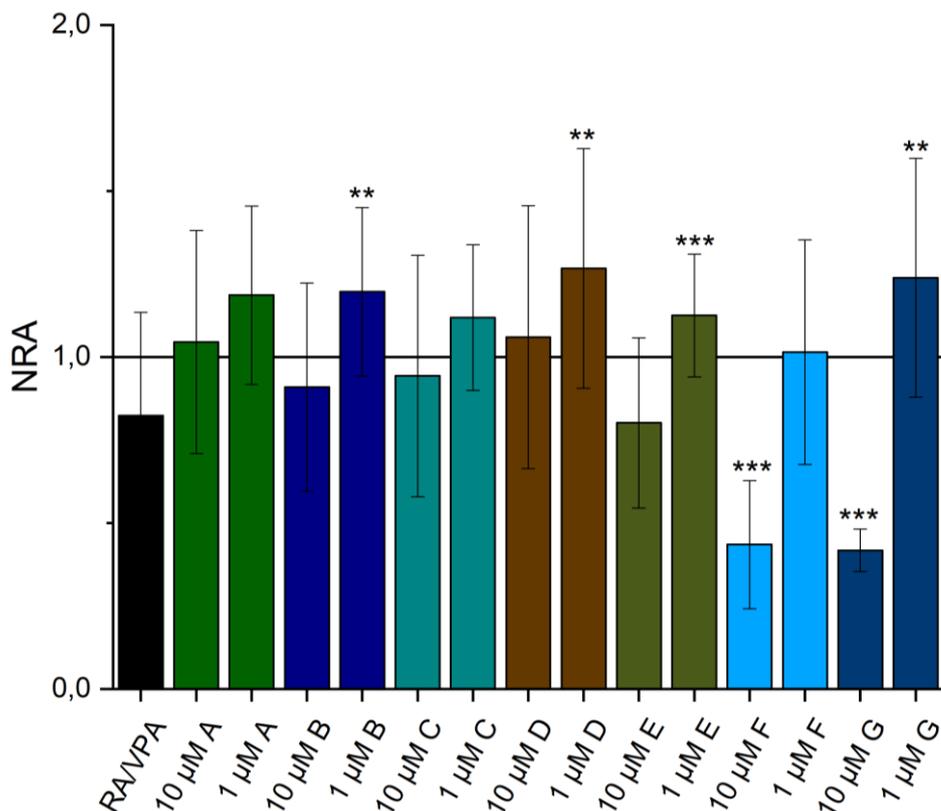


Abbildung 41: Darstellung der normierten Renilla Aktivität der Thioindirubine 5'-Thioindirubinessigsäure (A), 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methylthioindirubin (C), 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.

Die Untersuchung der Zellzahlen anhand der normierten Renilla Aktivität zeigte, dass große Substituenten an Position 5 einen negativen Einfluss auf die Zellzahl hatten. 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) senkten die Zellzahl im Vergleich zur Positivkontrolle in der Konzentration von 1 µM signifikant. Hier kann ein Trend beobachtet werden. Je größer der Substituent an Position 5, desto eher war die hohe Konzentration von 10 µM toxisch auf die Zellen. Wohingegen Fluor als kleiner Substituent noch keinen Einfluss auf die Renilla Aktivität hatte, zeigte Chlor schon einen leichten Einfluss und die größten beiden Substituenten Brom und die Methoxygruppe wirkten toxisch. Alle weiteren untersuchten Thioindirubine zeigten keinen Einfluss auf die Zellzahl, wobei durch 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methyl-5-fluorthioindirubin (D) und 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E) in der kleinen gemessenen Konzentration (1 µM) mehr Zellen bestimmt wurden als in der Positivkontrolle. Die erhaltenen Ergebnisse geben Spielraum für weitere Untersuchungen von Indirubinen und Thioindirubinen.

Bewertung

In der Literatur haben Suzuki et al. bereits im Jahr 2005 beschrieben, dass Indirubin die neutrophile Differenzierung von menschlichen myeloisch-leukämischen Zellen ausgelöst hat [207]. Die Differenzierung der Leukozyten wurde durch den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor und Indirubin gelöst in DMSO angeregt, wobei Indirubin alleine keine differenzierende Wirkung zeigte [207]. Im Vergleich dazu wurde im durchgeführten Versuch mit den embryonalen Vorderhirnzellen kein Faktor zur Anregung der Differenzierung zugegeben, das 5'-Methylthioindirubin gelöst in DMSO löst die Differenzierung aus, wobei auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO) normiert wurde.

Neben der Wirkung der Indirubine bei Leukämie wurden diese bereits vielfach als CDK- und GSK-3-Inhibitoren beschrieben. Beispielsweise zeigten 5-Fluorindirubin, 5-Chlorindirubin und 5-Bromindirubin starke inhibitorische Effekte auf die GSK-3, wobei die Wirkung auf die CDK1 und CDK5 nicht so stark waren [33]. Da diese Strukturen zu den untersuchten Thioindirubinen 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin sehr ähnlich sind, wäre es interessant, ob die synthetisierten Thioindirubine ein ähnliches Potential zur Inhibierung der GSK-3 zeigen. Der einzige Unterschied der Substanzen liegt in der an Position 5' substituierten Methylgruppe und der Tatsache, dass es sich bei den untersuchten Substanzen um Indirubine und nicht um Thioindirubine handelt. Interessanterweise zeigte die Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure die stärkste Inhibierung der CDK1 und CDK5 [32, 33, 129, 130]. 6,5-Dichloroindirubin-3'-monoxim und 6,5-Dichloroindirubin-3'-acetoxim zeigten die stärkste inhibitorische Wirkung auf GSK-3 [32, 33, 129, 130]. Allesamt sind jedoch an Position 5 substituiert, somit zeigen möglicherweise die getesteten und an Position 5 substituierten Thioindirubine auch eine Wirkung auf die verschiedenen Kinasen. Auf die GSK-3 zeigte Indirubin-3'-monoxim eine gute inhibitorische Wirkung, welche mit ihrem IC_{50} -Wert von $0,022 \mu\text{M}$ unter dem von Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure ($0,08 \mu\text{M}$) und dem 6,5-Dichloroindirubin-3'-monoxim und dem 6,5-Dichloroindirubin-3'-acetoxim (je $0,004 \mu\text{M}$) lag.

In einer Untersuchung von Lange et al. wurden verschiedene GSK-3-Inhibitoren auf ihre Wirkung in der Neurogenese von menschlichen neuronalen Vorläuferzellen untersucht [142]. Dabei wurden unter anderem Kenpauillone, SB-216763 und Indirubin-3'-monoxim als GSK-3-Inhibitoren untersucht [142]. In der Literaturstelle wurde Indirubin-3'-monoxim beschrieben, es wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Indirubin-3'-monoxim handelte, da die Substanz käuflich erworben wurde [142].

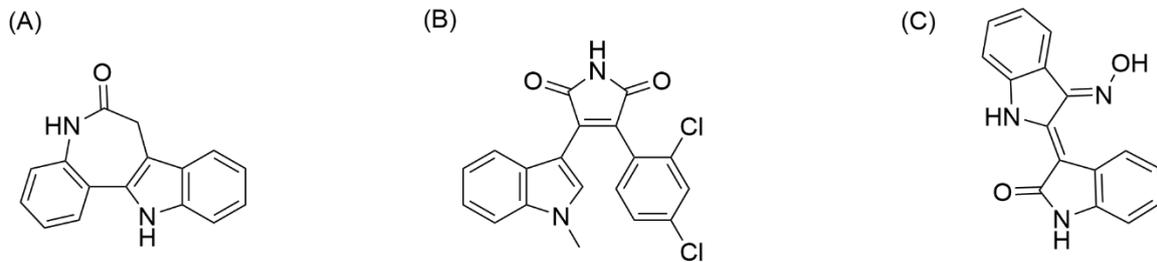


Abbildung 42: Darstellung der Strukturen von Kenpaullon (A), SB-216763 (B) und Indirubin-3'-monoxim (C).

In dieser Untersuchung zeigten Kenpaullon und SB-216763 die stärkste Inhibierung der GSK-3, wobei der Phosphorylierungsstatus der Glykogensynthase gemessen wurde [142]. Hierbei handelt es sich um ein spezifisches Substrat der GSK-3 [142]. Anschließend wurden Kenpaullon (1 μ M) und SB-216763 (3 μ M) in Bezug auf die Neurogenese untersucht [142]. Die Substanzen wurden auf differenzierende ReN Zellen gegeben und erhöhten den Anteil an Neuronen [142]. Durch Kenpaullon konnten mehr als doppelt so viele Neuronen bestimmt werden, durch SB-216763 mehr als die 1,5-fache Menge [142], wodurch Kenpaullon als deutlich aktivere Substanz erscheint, da dies in der kleineren Konzentration getestet wurde. Außerdem haben beide Substanzen die Anhäufung von β -Catenin gefördert [142]. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert wurde, wobei laut Lange et al. auch andere Signalwege eine Rolle spielen könnten [142]. Auch weitere, synthetisch gewonnene kleine Moleküle (TWS119) sind in der Literatur als starke GSK-3-Inhibitoren beschrieben und induzierten die neuronale Differenzierung über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg [208]. Weiterhin beschreiben Lange et al., dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch Indirubin-3'-monoxim neurodifferenzierend wirkt, es konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass dies über eine GSK-3-Inhibition im gezeigten Zellmodell stattfand [142].

In einer weiteren Studie von Manceur et al. wurde ein substituiertes 6-Bromindirubin-3'-monoxim auf die neuronale Differenzierung bei embryonalen Stammzellen der Maus untersucht [36]. Auch hierbei handelt es sich um einen GSK-3-Inhibitor [36]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proliferation in olfaktorischen Epithelzellen durch 6-Bromindirubin-3'-monoxim gesenkt wird, wohingegen die neuronale Differenzierung anstieg [36]. Dies zeigt, dass eine nicht toxisch angeregte Hinderung der Proliferation durch weniger aktive Agenzien differenzierungsfördernd wirkte. Durch die erhöhte Expressierung von Axin2 und Brachyury, welche beide eine Rolle im Wnt-Signalweg spielen, gehen Manceur et al. davon aus, dass durch das 6-Brom-3'-indirubin-monoxim der Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert wurde [36]. Da der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch in der adulten Neurogenese eine Rolle spielt [209], wäre eine Untersuchung dieses Signalwegs bei den untersuchten Substanzen, allen voran dem 5'-Methylthioindirubin, von Interesse. Außerdem wären Substanzen, welche an Position 6 substituiert sind, weiterhin von Interesse, um zu sehen, welchen Einfluss diese Position auf die Neurodifferenzierung bei den embryonalen Vorderhirnzellen hat.

Weiterhin ist eine Strukturähnlichkeit der untersuchten Thioindirubine mit Hesperadin gegeben, wie in der folgenden Abbildung gezeigt ist.

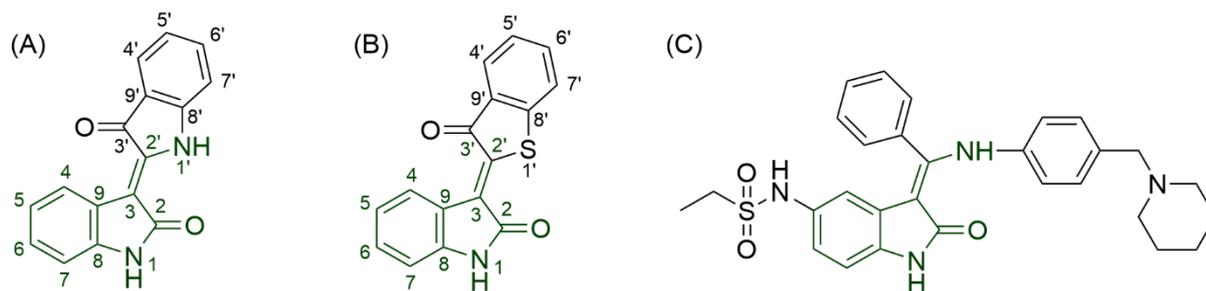


Abbildung 43: Darstellung der Strukturen von Indirubin (A), Thioindirubin (B) und Hesperadin (C) mit ihren Strukturähnlichkeiten in grün.

Amabile et al. beschreiben die dedifferenzierende Wirkung von Hesperadin auf Myoblasten, wobei dies durch eine Inhibition der Aurora B Kinase geschah [210]. Durch die große strukturelle Ähnlichkeit der Indirubine, insbesondere der untersuchten Thioindirubine, welche an Position 5 substituiert sind, genau wie das gezeigte Hesperadin, wäre es interessant, ob diese neben der leichten differenzierungsinduzierenden Aktivität auch eine dedifferenzierende Wirkung zeigen.

Im direkten Vergleich mit dem vielversprechenden Prenylflavonoid Xanthohumol C, welches im dualen Reporterproteinassay bereits untersucht worden ist, zeigt das 5'-Methylthioindirubin eine ähnlich gute Wirkung. Xanthohumol C wurde als neurodifferenzierend eingestuft. Im Assay wurde eine differenzierungsinduzierende Aktivität von etwa 5,5 im Mittel bei einer Konzentration von 10 μM bestimmt [211]. Im Vergleich dazu ist die differenzierungsinduzierende Aktivität des untersuchten 5'-Methylthioindirubins mit einem Wert von 5,13 ähnlich gut. Somit ist auch das 5'-Methylthioindirubin eine sehr vielversprechende Substanz.

3,4-annelierte, peptidartige Indolderivate

Neben den Thioindirubinen wurden auch 3,4-annelierte, peptidartige Indolderivate auf ihre differenzierungsinduzierende Aktivität untersucht. Hierbei handelt es sich um Indolactam, Lyngbyatoxin, Teleocidin B und Olivoretin.

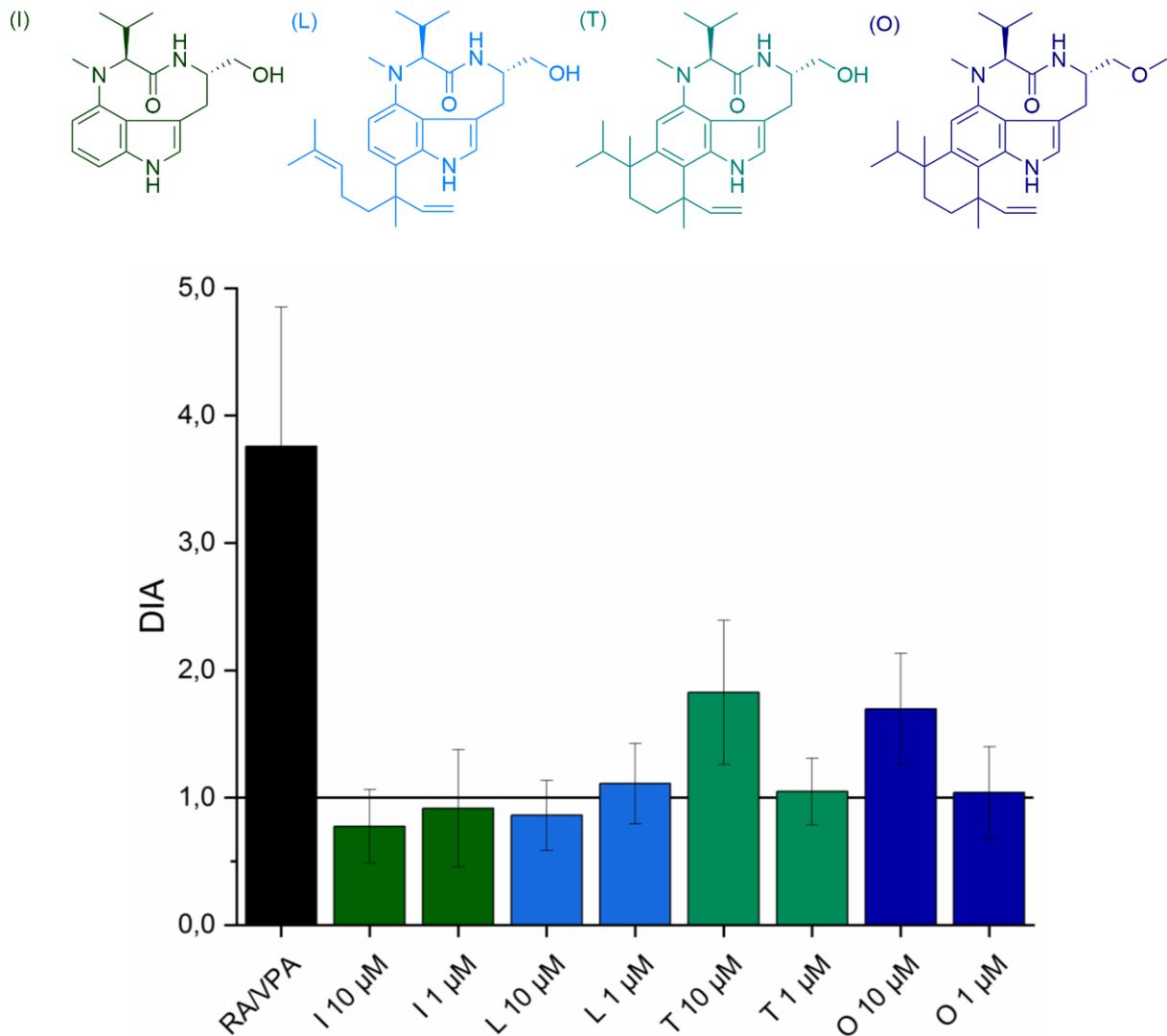


Abbildung 44: Oberer Abschnitt: Darstellung der Strukturen von Indolactam (I), Lyngbyatoxin (L), Teleocidin (T), Olivoretin (O) nach dem nachfolgend verwendeten Farbschema. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Indolderivate in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$).

Ergebnis dieser Studie war, dass keine der untersuchten Substanzen einen signifikanten differenzierungsinduzierenden Effekt auf die embryonalen Vorderhirnzellen der Maus zeigte. Nur Teleocidin und Olivoretin (10 µM) zeigten leicht erhöhte Werte im Gegensatz zum Vehikel, welche jedoch durch die toxische Wirkung auf die Zellen und die damit niedrigere Renilla Aktivität erklärt werden kann (Abbildung 45).

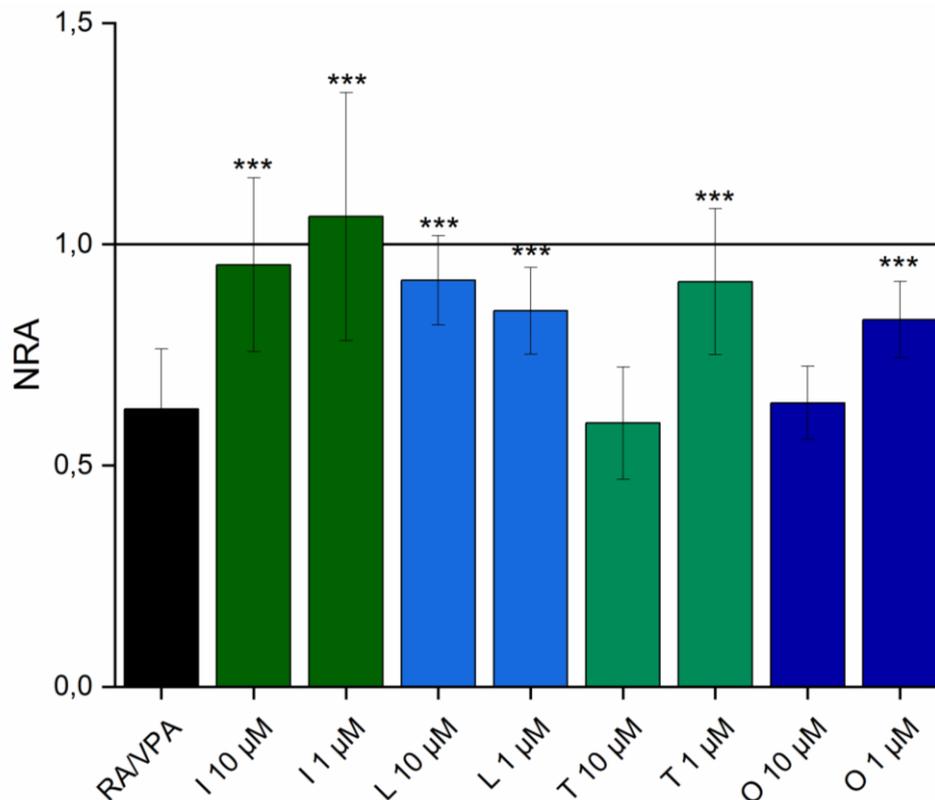


Abbildung 45: Darstellung der normierten Renilla Aktivität der Indolderivate Indolactam (I), Lyngbyatoxin (L), Teleocidin (T), Olivoretin (O) Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.

Die normierte Renilla Aktivität der Indolalkaloide zeigt, dass nur Teleocidin und Olivoretin in der hohen Konzentration (10 µM) etwa auf dem Zellzahllevel der Positivkontrolle waren. Hier kann eine Struktur-Aktivitätsbeziehung aufgestellt werden, da Teleocidin und Olivoretin strukturell nahezu identisch sind. Der cyclische Rest, gebunden an den Benzolring des Grundgerüsts, scheint einen negativen Einfluss auf die Viabilität der embryonalen Vorderhirnzellen der Maus zu haben. Lynbyatoxin hingegen besitzt keinen an den Benzolring gebundenen cyclischen Ring, was die Zellzahl nicht beeinflusst. In der kleinen Konzentration (1 µM) zeigten alle untersuchten Indolalkaloide und in den hohen Konzentrationen Indolactam und Lynbyatoxin (10 µM) signifikant höhere Zellzahlen im Vergleich zur Positivkontrolle. Verglichen mit dem Vehikel hatten alle getesteten Indolalkaloide keine signifikant höhere Zellzahl.

Bewertung

Durch die erhaltenen Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, dass die Indirubine bzw. Thioindirubine und das Indolactam einen gemeinsamen Pharmakophor haben. Zwar zeigen die Thioindirubine, allen voran das 5'-Methylthioindirubin eine Aktivität in Bezug auf die

Neurogenese, für das Indolactam und Derivate davon wurde jedoch keine Aktivität nachgewiesen.



Abbildung 46: Indolactam (A) und Kenpaullon (B) mit ihren Strukturähnlichkeiten in grün.

Auch die strukturelle Ähnlichkeit zu Kenpaullon ist bei Indolactam gegeben, welche in Abbildung 46 dargestellt ist. Charakteristisch für beide Substanzen ist der Indolring, der daran gebundene Ring unterscheidet sich jedoch erheblich. Möglicherweise ergibt sich daraus das differenzierende Potential von Kenpaullon. Die Untersuchung von Kenpaullon erfolgte jedoch auf ReN Zellen, möglicherweise ist auch der Unterschied der Zellkultur dafür ausschlaggebend, dass eine Substanzklasse kein Potential zeigt [142].

Wie bereits für die Indirubine ist auch für die 3,4-annelierten, peptidartigen Indolderivate eine differenzierungsinduzierende Aktivität auf promyeloischen Zellen von Nakayasu et al. beschrieben [212]. Sowohl Teleocidin als auch Lynbyatoxin A zeigen hier eine differenzierungsinduzierende Wirkung der Zellen zu Makrophagen [212].

Chen et al. beschrieben 2009, dass Indolactam die Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen in Richtung der Pankreaslinie ausgelöst hat, welche durch die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Pdx1 gemessen wurde [38]. Da die von Chen et al. untersuchten Zellen aus dem endodermalen Keimblatt und neuronale Stammzellen aus dem ektodermalen Keimblatt entstehen, ist hiermit möglicherweise der Unterschied begründet, weshalb Indolactam und Derivate davon keine Differenzierung in embryonalen Vorderhirnzellen auslösen.

In einem Patent von Choi et al. wird beschrieben dass Indolactam und Derivate davon im Nervensystem schützende Wirkung gegen toxische Schäden haben [37]. Hierbei wirken die Substanzen schützend auf die Schädigung kortikaler Neuronen durch verschiedene Glutamatagonisten [37]. Eine Substanz, welche sowohl neuroprotektiv als auch neurodifferenzierend wirkt, wäre wünschenswert. Dies kann jedoch durch die Untersuchung der 3,4-annelierten, peptidartigen Indolderivate im dualen Luciferase-Assay nicht beschrieben werden, da hier keine Wirkung gezeigt werden konnte.

5.2 Diskussion der Differenzierungsinduzierenden Aktivitäten

Die Ergebnisse des Screenings in Bezug auf die Neurogenese zeigen, dass die Problematik der Vorauswahl von Substanzen offensichtlich nicht durch beschriebene Parameter machbar ist. Weder die differenzierende Wirkung von Substanzen auf diverse, andere Zelllinien, noch ihr neuroprotektives Potential sagen etwas über die Wirkung auf die embryonalen Vorderhirnzellen aus.

Trotz der vielfach beschriebenen neuroprotektiven Aktivitäten von *B. monnieri* konnte im Screening der Extrakte zur Neurogenese keine besonders große Wirkung nachgewiesen werden. Obwohl diverse Marker, wie beispielsweise BDNF, welche auch bei Auslösung der Differenzierung entscheidend sind, teilweise durch den Extrakt von *B. monnieri* oder durch die darin enthaltenen Bacoside als gesteigert beschrieben sind, konnten keine Effekte gezeigt werden. Möglicherweise lagen hier auch antagonistische Effekte der verschiedenen Inhaltsstoffe vor, welche dann die Wirkung im Screening vermindert haben. Da die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltene Wasserfraktion jedoch in hohen Konzentrationen die höchste differenzierungsinduzierende Aktivität der untersuchten Fraktionen zeigte, wäre es denkbar, dass diese Fraktion interessante Substanzen zur Differenzierung enthält. Diese Fraktion wurde jedoch nicht weiter untersucht. Der mittels Festphasenextraktion erhaltene Extrakt (70/30), welcher Luteolin enthält, war am aktivsten in Bezug auf die differenzierungsinduzierende Aktivität. Dies konnte nahezu komplett dem Luteolin zugeschrieben werden.

Die in *B. monnieri* enthaltene Betulinsäure, welche auf diverse Zelllinien differenzierend wirkt, zeigte keine Wirkung. Trotz der Tatsache, dass die Betulinsäure bei der Differenzierung von Osteoblasten den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert [200] und dieser bei der Auslösung der Neurogenese häufig eine Rolle spielt, konnte keine differenzierungsinduzierende Aktivität bestimmt werden.

Die vielfach beschriebenen, aktiven Bacoside der Pflanze *B. monnieri* zeigten keine Wirkung auf die Neurogenese. Diese Strukturen der Bacoside, welche zur Gruppe der Saponine gehören, sind aufgrund ihrer Amphiphilie zum Passieren der Blut-Hirn-Schranke gut geeignet. Somit ist diese Substanzklasse weiterhin interessant. Die bereits bestehenden Studien zu Saponinen des Ginsengs, welche die Neurogenese auslösen könnten, wären ein neuer Forschungsstartpunkt für die Untersuchung von Extrakten und angereicherten Extrakten in Bezug auf die Neurodifferenzierung mit Hilfe des dualen Reporterproteinassays.

Die Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität von den Flavonoiden, welche in *B. monnieri* enthalten sind, ergab, dass Apigenin, welches in Spuren in den untersuchten Extrakten vorliegt, die stärkste differenzierungsinduzierende Aktivität hat. Luteolin und Luteolin-7-glucosid haben bei gleicher Konzentration nicht so starke Effekte gezeigt.

Bei den untersuchten Indolalkaloiden, den dazu gehörigen Thioindirubinen und 3,4-annelierten, peptidartigen Indolderivaten, zeigten die Thioindirubine die stärkste Aktivität. Durch die

Untersuchung der differenzierungsinduzierenden Aktivität wurde ein Hinweis darauf gegeben, welches Potential in den Thioindirubinen steckt. Mit dem 5'-Methylthioindirubin, welches die aktivste getestete Substanz ist, wird Ausblick für weitere synthetisierbare, kleine Moleküle geschaffen. Die Untersuchungen der 3,4-annelierten, peptidartigen Indolalkaloide zeigen, dass die bisher untersuchten Strukturen Indolactam, Lyngbyatoxin, Teleocidin und Olivoretin keine neurodifferenzierungsinduzierende Aktivität aufgewiesen haben. Ein gemeinsamer Pharmakophor der 3,4-annelierten, peptidartigen Indolderivate und der Thioindirubine kann somit nahezu ausgeschlossen werden.

6 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Auffindung bioaktiver Naturstoffe zur Anwendung auf die Differenzierung neuronaler Stammzellen.

Aufgrund der vielfach in der Literatur beschriebenen Aktivität der Bacoside in *B. monnieri* in Bezug auf die Neuroprotektion war es Ziel dieser Arbeit, einen möglichst bacosidreichen Extrakt herzustellen. Durch die sehr große Strukturähnlichkeit dieser Bacoside ist eine Auftrennung relativ schwierig, weswegen die Anreicherung der Substanzgruppe erfolgte. Eine erste Anreicherung von Bacosid A, einem Substanzgemisch aus vier Bacosiden, wurde bereits über die Flüssig-Flüssig-Extraktion erzielt. Hierbei wurde ein Anreicherungsfaktor von etwa zwei bestimmt. Weiterhin wurde die Festphasenextraktion, eine heute vielfach verwendete Methode zur Probenaufarbeitung, zur weiteren Anreicherung von Bacosid A verwendet. Durch die Festphasenextraktion konnte ein fünffacher Anreicherungsfaktor vom Rohextrakt bis hin zum Festphasenextrakt errechnet werden. Neben den Bacosiden wurde weiterhin Luteolin durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion und die Festphasenextraktion angereichert. Dabei konnte im Flüssig-Flüssig-Extrakt bereits mehr als die doppelte Menge Luteolin bestimmt werden. Durch die Festphasenextraktion konnte erneut eine Anreicherung um die fünffache Menge erzielt werden, wodurch der Anreicherungsfaktor vom Rohextrakt zum Festphasenextrakt bei etwa zehn lag. Die Methode der Festphasenextraktion hat sich hierbei als geeignete Methode zur Aufarbeitung eines Extraktes gezeigt, da hier Substanzklassen sehr gut angereichert werden. Besteht bereits eine HPLC Methode zur Auftrennung von Substanzen, kann diese in der Festphasenextraktion möglicherweise leicht modifiziert angewendet werden und führt mit ziemlicher Sicherheit zu guten Ergebnissen.

Bei der weiteren Untersuchung der Triterpenextrakte von *B. monnieri* im Vergleich mit Referenzsubstanzen ist deutlich geworden, dass Referenzsubstanzen nicht immer ohne weitere Überprüfung verwendet werden können. Bacosin, ein vielfach in der Literatur beschriebenes Triterpen, welches in *B. monnieri* enthalten ist, wurde mittels Strukturaufklärung als Betulin-säure identifiziert. Da es nicht auszuschließen ist, dass Bacosin in anderen Pflanzenmaterialien möglicherweise vorkommt, ist in Zukunft eine genaue Untersuchung dieser vor einer weiteren pharmakologischen Untersuchung entscheidend. Weiterhin gilt, dass eine Strukturaufklärung ausschließlich durch strukturgebende Methoden wie beispielsweise NMR (1D und 2D) stattfinden kann, da nur dadurch die Zusammenhänge und Kopplungen in den Molekülen bestimmt werden können.

Das Screening bioaktiver Naturstoffe gilt als wichtiger Forschungsansatz in der Neurogenese. Zur Findung von Substanzen, welche hierbei eine Rolle spielen, wurden drei Ansätze verfolgt. Diese Herangehensweise hat sich als schwierig dargestellt, da für viele der Substanzen eine Aktivität vermutet wurde, diese jedoch im Screening nicht nachgewiesen werden konnte. Da in dem verwendeten Reporterproteinassay ein Gemisch aus Retinsäure und Valproinsäure als

Positivkontrolle verwendet wurde, wurden möglicherweise Substanzen, welche leicht differenzierend wirkten, nicht weiter beachtet, da die Wirkung gegenüber der Positivkontrolle nicht auffällig ist. Einzig ein Thioindirubin zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle die vermutete Wirkung. Hierbei handelt es sich um 5'-Methylthioindirubin.

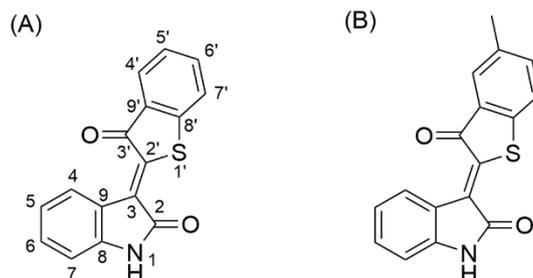


Abbildung 47: Darstellung von Thioindirubin (A) und 5'-Methylthioindirubin (B).

Da sich die Substitution an Position 5' durch die Methylgruppe als sinnvoll erwiesen hat, kann diese Struktur als Leitstruktur für zukünftige Synthesen gelten. Eine Untersuchung verschiedener Substitutionsmuster des Benzolrings in direkter Nachbarschaft zum Schwefel (4'-7') ist auch von großem Interesse. Die Einführung einer Hydroxygruppe als Substituent, welche die Polarität steigert, wäre eine künftig interessante Struktur. Mit Hilfe des Screenings und einem Vergleich mit der Leitstruktur 5'-Methylthioindirubin könnte weiterhin das Potential der Thioindirubine untersucht werden.

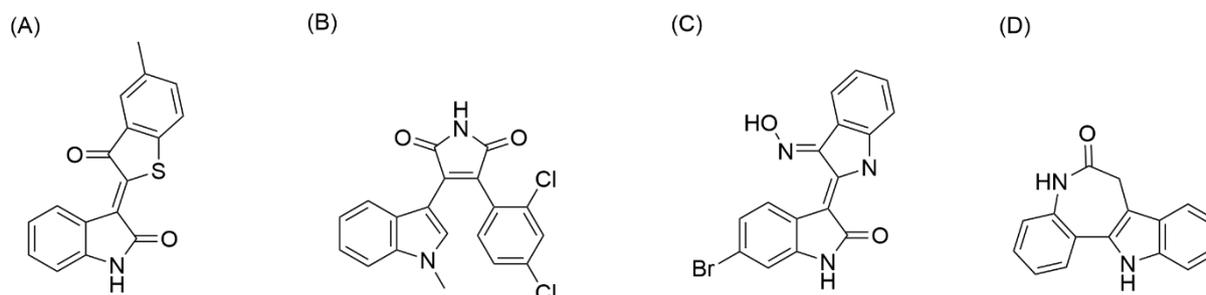


Abbildung 48: Darstellung aller differenzierungsinduzierenden Indolalkaloide, welche Strukturähnlichkeiten mit 5'-Methylthioindirubin (A) aufweisen: Kenpaullon (B), SB-216763 (C) und 6'-Bromoindirubin-3'-monoxim (D).

Die dargestellten Indolalkaloide, welche alle eine Strukturähnlichkeit zum untersuchten 5'-Methylthioindirubin aufweisen, wirkten in unterschiedlichen Assays differenzierungsinduzierend. Kenpaullon, SB-216763 und 6'-Bromoindirubin-3'-monoxim wirkten außerdem alle inhibierend auf die GSK-3. Damit wäre eine Untersuchung der Inhibition dieser Kinase mit den synthetisierten Thioindirubinen ein zukünftiger Forschungsansatz, um auch hierfür eine Struktur-Aktivitätsbeziehung aufstellen zu können. Außerdem wäre es interessant, die dargestellten Indolalkaloide untereinander zu vergleichen, um das Potential des 5'-Methylthioindirubin in die bestehende Literatur einzuordnen. Da einer der entscheidenden weiteren Schritte auch die

Untersuchung des Signalweges, durch welchen die Differenzierung ausgelöst wird, ist, empfiehlt sich im Weiteren die Untersuchung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Dieser war, zumindest zum Teil, bei den dargestellten Substanzen für die Differenzierungsinduktion zuständig. Weiterhin gilt es, die Neubildung der Neuronen durch 5'-Methylthioindirubin mit Hilfe einer Antikörperfärbung nachzuweisen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Merck KGaA, VWR International GmbH und Carl Roth GmbH & Co. KG erworben. Die Referenzsubstanzen Bacosid A (Batch 10395, Reinheit $\geq 90,0\%$), Bacosin (Batch 10980, Reinheit $\geq 90,0\%$), Betulinsäure (Batch 7280, Reinheit $\geq 90,0\%$) wurden bei PhytoLab GmbH & Co. KG gekauft. Zudem wurde weiteres Bacosin (Batch 00002012-T11G, Reinheit $\geq 90,0\%$) der Firma ChromaDex Inc. erworben. Luteolin (Batch 103723-129, Reinheit $\geq 98,0\%$) und Apigenin (Batch 0436771-54, Reinheit $\geq 98,0\%$) wurden bei der Firma Cayman Chemical Company erworben. Luteolin-7-glucosid wurde bei Sigma Aldrich gekauft (Batch #BCBZ5943, Reinheit $\geq 98,0\%$). Für die Extraktion wurden Lösungsmittel von VWR International GmbH in technischer Qualität verwendet, welche mittels Destillation aufgereinigt wurden. Für HPLC-Analysen und IT-TOF-Analysen wurden spezielle Lösungsmittel mit höherer Reinheit verwendet (HPLC grade, VWR; UHPLC-MS grade). Deuteriertes Chloroform (Reinheit $\geq 99,7\%$) wurde bei Carl Roth GmbH & Co. KG gekauft.

7.2 Extraktion und Analyse

7.2.1 Trockenmassebestimmung

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurde das Gerät der Firma Sartorius, Moisture Analyzer Modell MA 35, verwendet. Hierfür wurden etwa 2 g Pflanzenmaterial eingewogen und bei $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min erhitzt. Das Gerät gab den Wert der Trockenmasse in % an. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte im Triplikat.

7.2.2 Pflanzenmaterial

Es wurde ein Pulver des ganzen Krauts der Pflanze *B. monnieri* der Firma Terra Elements verwendet. Die genaue Bezeichnung lautet Brahmi Pulver-Bio-Pur, Terra Elements GmbH, Deutschland, die verwendete Charge war L2018270711. Dieses Pulver wurde für die Vorversuche (7.2.3) und die Extrakterstellung (7.2.4) verwendet und der gewonnene BME wurde zur weiteren Aufarbeitung verwendet.

Weitere Pflanzenmaterialien wurden bei Svatv, Indien (Brahmi Powder, PP/ORG/BM/1905001), bei WeightWorld, England (Bio Brahmi, 20211101) und bei AllgäuPowers, Deutschland (Bio Brahmi Pulver, X0010HSF2Z) erworben.

Des Weiteren wurden bei Braineffect, Deutschland (Focus), The Himalaya Drug Company, Indien (Brahmi Mind Wellness), Shree Baidyanath Ayurved Bhawan Pvt Ltd, Indien (Brahmi Bati) Nahrungsergänzungsmittel erworben. Alle Inhaltsstoffe dieser Nahrungsergänzungsmittel sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Extrakterstellung der Nahrungsergänzungsmittel erfolgte wie in 7.2.3 beschrieben, die Aufreinigung erfolgte wie in 7.2.5.1 beschrieben und der Chloroform Extrakt wurde anschließend untersucht.

Tabelle 6: Darstellung der Inhaltsstoffe aller untersuchten Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmittel

Pflanzenmaterial / Nahrungsergänzungsmittel	Inhaltsstoffe
Brahmi Pulver-Bio-Pur (Terra Elements, Deutschland)	Brahmi Blätter
Brahmi Powder (Svatv, Indien)	<i>Bacopa monnieri</i> Pulver
Bio Brahmi (Weight World, England)	Brahmi Blätter
Bio Brahmi Pulver (Allgäu Power, Deutschland)	Brahmi Blätter
Focus (Braineffect, Deutschland)	Citicolin, Acetyl-L-Carnitin, Extrakte von <i>Bacopa monnieri</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Panax ginseng</i> und <i>Piper nigrum</i> , Vitamin B ₅ , Vitamin B ₁₂
Brahmi Mind Wellness (The Himalaya Drug Company, Indien)	Extrakt von <i>Bacopa monnieri</i>
Brahmi Bati (Shree Baidyanath Ayurved Bhawan Pvt Ltd, Indien)	<i>Bacopa monnieri</i> , <i>Onosma bracteatum</i> , <i>Piper nigrum</i> , <i>Ras Sindoor</i> , <i>Convolvulus pluricaulis</i> , <i>Acorus calamus</i> , Kupferpyrit

7.2.3 Vorversuche

Für die Vorversuche wurde 1 g Pflanzenmaterial auf 10 mL Lösungsmittel verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde vor der Extraktion für 24 h mit Hexan verschlossen gerührt, anschließend wurde das Hexan abgenommen, das Pflanzenmaterial getrocknet und für 24 h oder die untersuchte Zeitdauer mit Methanol/Wasser (90/10) (v/v) oder dem bestimmten Lösungsmittel extrahiert. Die Untersuchung folgender Lösungsmittel wurde in Betracht gezogen: Methanol, Ethanol und Wasser. Des Weiteren wurden Gemische von Methanol und Ethanol mit Wasser (v/v) untersucht und verglichen. Die erhaltenen Lösungen wurden direkt oder verdünnt mit der unter 7.2.6 beschriebenen Methode an der HPLC untersucht.

7.2.4 Extrakterstellung

Zur Extrakterstellung im größeren Maßstab wurden in drei Ansätzen jeweils 200,00 g Pflanzenmaterial zuerst für 24 h mit 2 L Hexan bei Raumtemperatur gerührt, das Hexan wurde anschließend abgenommen und Pflanzenmaterial wurde getrocknet. Danach wurde für 24 h mit 2 L einer Methanol/Wasser (90/10) (v/v) Mischung jeweils bei Raumtemperatur unter Rühren

mazeriert. Die erhaltenen Lösungen wurden filtriert (Filterpapier qualitativ, 240 mm, 313, VWR 516-0809), das organische Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck und das übrige Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Der Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung kühl und trocken im Kühlschrank gelagert.

7.2.5 Extraktaufreinigung

7.2.5.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE)

Der aus Kapitel 7.2.4 erhaltene Extrakt wurde mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion weiter fraktioniert. Es wurden 3,00 g des erhaltenen Extraktes eingewogen, in 100 mL Wasser gelöst und zuerst zwei Mal gegen unpolare Lösungsmittel ausgeschüttelt (n-Hexan, Chloroform, jeweils 75 mL). Anschließend wurde die übrige Wasserphase zwei Mal gegen 75 mL n-Butanol ausgeschüttelt. Der Versuch wurde im Triplikat durchgeführt.

7.2.5.2 Fraktionierende Festphasen-Extraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion wurde mittels einer C₁₈ ec Kartusche (10000 mg/70 mL, Chromabond, LOT 38.281) unter vermindertem Druck (maximaler Druck: 0,68 bar) vorgenommen. Die Kartusche wurde mit Methanol und Wasser konditioniert (jeweils 100 mL), bevor anschließend der in Wasser gelöste butanolische Extrakt (LLE) (etwa 40 mg) aufgebracht wurde. Dieser wurde mit 100 mL Gemischen aus Wasser und Acetonitril heruntergelöst. Die schrittweise Erhöhung des Acetonitril-Volumens erfolgte bis zu einem Prozentsatz von 40 % Acetonitril in 10 % Schritten, schlussendlich wurde der auf der Säule verbleibende Rest mit Acetonitril von der Säule entfernt. Alle Lösungen wurden getrennt voneinander aufgefangen, das Lösungsmittel wurde entfernt und die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank kühl und trocken gelagert. Der Versuch wurde im Triplikat durchgeführt.

7.2.5.3 Puriflash

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Betulinsäure wurde an dem Flash-Chromatographiesystem PuriFlash 4250 (ELSD) (Interchim) durchgeführt. Dabei wurde der Chloroform Extrakt (24 mg) mittels einer C₁₈ Säule (Phenomenex, Luna C₁₈ 5 u 15 x 250 mm) aufgereinigt. Ein Laufmittelgemisch von Wasser (A) und Methanol (B) wurde verwendet, wobei mit 40 % B gestartet wurde und die Konzentration an B innerhalb von 48 Minuten auf 95 % steigt und für 19 Minuten gehalten wurde, um die Betulinsäure zu erhalten.

7.2.6 HPLC-ELSD

Für die HPLC-Analytik zur Bestimmung des Gesamtbacosidgehaltes und zur Untersuchung des Chloroform Extraktes wurde ein System der Firma Shimadzu mit zwei Pumpen (LC-20AD), einem Probengeber (SIL-20AC HT), einem Säulenofen (CTO-20A) einem PDA Detektor (SPD-M20) und einem ELSD Detektor (LT II) verwendet. Zur Auftrennung wurde eine Phenomenex Luna C₁₈₍₂₎ Säule, (4,6 x 250 mm, 5 μ , 100 Å), bei 30 °C und einer Flussrate von 1 mL/min genutzt. Die mobile Phase war Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B).

Folgende Methoden wurde verwendet:

Tabelle 7: HPLC-ELSD-Methode 1 zur Bestimmung des Luteolingehaltes und des Bacosidgehaltes.

Zeit / min	B-Konzentration / %
00,01	25
33,00	38
49,00	60
50,00	95
51,00	95
52,00	25
60,00	25

Tabelle 8: HPLC-ELSD-Methode 2 zur Untersuchung von Bacosin und Betulinsäure.

Zeit / min	B-Konzentration / %
00,01	25
15,00	95
30,00	95
31,00	25
40,00	25

Alle Extrakt-Proben wurden vor der Messung an der HPLC-ELSD durch einen Nylon-Filter (Carl Roth, KC.64.1) filtriert.

7.2.7 HPLC-IT TOF

Für die HPLC-Analytik mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung (IT TOF) wurden ein System der Firma Shimadzu mit zwei Pumpen (LC-20AD), einem Probengeber (SIL-20AC HT), einem Säulenofen (CTO-20A) und einem PDA Detektor (SPD-M20) verwendet. Zur Auftrennung wurde eine Phenomenex Kinetex C₁₈ Säule (2,1 x 250 mm, 2,6 μ , 100 Å).

Die Interface Temperatur für die ESI Ionisierung lag bei 210 °C, die Flussrate des Zerstäubungsgases lag bei 1,5 L/min (Stickstoff), die negative Nadelspannung der ESI lag bei -3,5 kV und die positive Nadelspannung der ESI lag bei 3,5 kV. Für die Fragmentierung lag die Akkumulationszeit bei 20 ms für MS, bei 30 ms für MS² und bei 30 ms für MS³ mit dem Kollisionsgas (Argon) bei 100 % und 300 % Kollisionsenergie.

Tabelle 9: HPLC-IT TOF-Methode 3 zur Analyse der SPE Extrakte und der Betulinsäure in Extrakten und Nahrungsergänzungsmitteln.

Zeit / min	B-Konzentration / %
00,01	5
25,00	95
30,00	95
38,00	5

7.2.8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung und Bestimmung des Bacosid A Gehaltes wurde das Gemisch, welches aus den vier Bacosiden Bacosid A3, Bacopasid II, Bacopasaponin C und Bacopasid X besteht, verwendet. Die Kalibrierung wurde im Bereich von 0,5 mg/mL bis 1,7 mg/mL mittels HPLC mit der oben genannten Methode (Tabelle 7) vermessen. Nachdem für Bacosid A eine Reinheit von ≥ 90 % beim Hersteller angegeben wird, wird im Weiteren mit einer Reinheit von 100 % gerechnet.

Zur Kalibrierung und Bestimmung des Luteolingehaltes wurde im Bereich von 0,05 mg/mL bis 0,16 mg/mL mittels HPLC mit der oben genannten Methode (Tabelle 7) vermessen. Nachdem für Bacosid eine Reinheit von ≥ 98 % beim Hersteller angegeben wird, wird im Weiteren mit einer Reinheit von 100 % gerechnet.

7.2.9 Gefriertrocknung

Alle erhaltenen Fraktionen oder Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und an der Gefriertrocknungsanlage (Christ Alpha 2-4 LDplus) getrocknet.

7.2.10 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahmen der NMR Spektren für die Strukturuntersuchung von Bacosin und Betulinsäure wurde von Prof. Dr. Eisenreich, Lehrstuhl für Biochemie, in Garching vorgenommen. Hierbei wurden die NMR Spektren am Bruker AV-III-HD Spektrometer (500 MHz) in perdeutierten Lösungsmitteln aufgenommen. Für die Aufnahme der Spektren wurden zwei unterschiedliche Probenköpfe verwendet, für die ^1H Spektren der TXI und für die ^{13}C Spektren der Cryo-QNP. Mit der Bruker TOPSPIN Software (Version 3.5) wurden die Spektren weiterverarbeitet. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben. Als Auswertesoftware für die Spektren wurde MestreNova-14 verwendet. Die NMR Vorhersagen wurde mittels I-Lab 2.0 (Algorithm Version v14.0.1.34189), MestreNova-14 (Prediction Tool) und mittels ChemDraw Professional 16.0 (ChemDraw Prediction) durchgeführt.

7.2.11 GC-MS

Für die GC-MS Analytik wurde ein Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer der Firma Shimadzu (QP2010SE, EI) verwendet. Mittels einer Hochtemperatursäule (Machery-Nagel, 5 HT) wurden die Spektren aufgenommen, wobei Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) (Injektionsvolumen: 1,0 μ L) als Derivatisierungsreagenz verwendet wurde. Die Injektionstemperatur betrug 275 °C, die Temperatur der Ionenquelle lag bei 250 °C und die Interface Temperatur lag bei 280 °C. Als Trägergas wurde Helium bei einer Flussrate von 1,5 mL/min verwendet. Die untersuchten Proben wurden in Chloroform (CHCl_3) gelöst (1 mg/mL, Injektionsvolumen: 1,0 μ L).

7.2.12 Absorbanzmessungen

Die Messungen der Absorbanzspektren verschiedener Thioindirubine wurde an einem ClarioSta (BMG Labtech) durchgeführt. DMSO als Lösungsmittel wurde mitgemessen und abgezogen.

7.2.13 Schmelzpunktmessung

Die Messung der Schmelzpunkte erfolgte an einem MPM-H2 Schmelzpunktmessgerät.

7.3 Zellkulturarbeiten

Der duale Luciferase-Assay wurde am Institut für Experimentelle Neuroregeneration von Prof. Dr. Sébastien Couillard-Després an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität unter Anleitung von Dr. Lara Bieler oder durch diese durchgeführt. Die Ergebnisse der Thioindirubine wurden in einem Zweitversuch verifiziert.

Die embryonalen Vorderhirnzellen der Maus wurden nach einem Protokoll von Oberbauer et al. vorbereitet [213]. Die Passage 1 dieser Zellen wurden mittels Elektroporation (Amaxa Nucleofector II, Programm A-033) mit zwei Luciferasen, *Photinus pyralis* und *Renilla reniformis* transfiziert. Hierzu wurde das Nucleofector-Maus-Transfektionskit für neuronale Stammzellen (Lonza) verwendet. Anschließend wurden die Zellen in Neurobasal-Medium (Gibco) resuspendiert. Dieses enthielt zusätzlich 2 % B27 (Gibco), 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin und 1 % fötales Kälberserum. Als Abkürzung für dieses Mediumgemisch wird im Folgenden NB-1 % FBS verwendet.

Die Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well (200 μ L) in beschichtete, weiße 96-Well Platten (Greiner) ausgesät. Die Zellzählung wurde mittels eines Zellzählgerätes

(CASY TT150) durchgeführt. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit Poly-L-Ornithin (Sigma, 100 µg/mL) und Laminin (Sigma, 5 µg/mL).

Nach 24 h Kultivierung wurde das Medium auf den Zellen durch NB-1 % FBS mit der enthaltenen Menge an Extrakten oder Indolalkaloiden ersetzt. Die Extrakte, Reinsubstanzen und Indolalkaloide wurden in DMSO gelöst, wobei die Konzentration von DMSO im Well weniger als 0,05 % betrug. Anschließend wurden die Zellen für weitere 72 h bei 37 °C inkubiert. Nach 72 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden für 10 Minuten lang bei Raumtemperatur lysiert. Dafür wurden 25 µL eines Lysepuffers pro Well (25 mM Tris-HCl, pH 7,8, 2 mM DTT, 1 % Triton X-100, 2mM EDTA und 10 % Glycerin) verwendet. 80 µL des Firefly Puffers wurden pro Well zugegeben. Der Firefly Puffer besteht aus 25 mM Glycylglycine (Acros), 15 mM K_xPO_4 (pH 8,0), 4 mM EGTA, 15 mM $MgSO_4$, 2 mM ATP, 1 mM DTT, 0,1 mM Coenzym A und 75 mM D-Luciferin (Synchem). 100 µL eines frisch hergestellten Renilla Puffers wurden pro Well zugegeben. Der Renilla Puffer besteht aus 1,1 M NaCl, 2,2 mM Na_2EDTA , 0,22 M K_xPO_4 (pH 5,1), 0,44 mg/mL BSA, 1,3 mM NaN_3 , 1,43 mM Coelenterazin (Promega). Die Biolumineszenz wurde unter Verwendung eines TriStar Multimode Mikrotiterplatten-Lesegeräts LB 941 (Berthold Technologies) bestimmt.

7.4 Synthesen der Thioindirubine

Die Synthesen der Thioindirubine wurden von Jennifer Killinger und Alexander Widmann unter Anleitung von Prof. Dr. Herbert Riepl durchgeführt.

Allgemeine Synthesevorschrift

Isatin oder Derivate (1) (Substitution an Position 5) davon und Rhodanin (2) wurden im gleichen Stoffmengenverhältnis eingesetzt und in 35 mL Pyridin gelöst und mit 2 mL Wasser versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 40 mL Tetrahydrofuran zugesetzt und das Gemisch wurde für zwei Stunden unter Rückflusskühlung zum Sieden erhitzt. Das Gemisch wurde im Eisbad abgekühlt. Das auskristallisierte Produkt (3) wurde mittels Vakuumfiltration abgetrennt und für mindestens 24 Stunden im Abzug getrocknet. Anschließend erfolgte die Hydrolyse der Produkte. Dies geschah unter Zugabe von 50 mL einer Natriumhydroxidlösung (10 %). Die Suspension wurde auf 60 °C für eine Stunde unter Rühren erhitzt. Danach wurde das Gemisch im Eisbad gekühlt und anschließend wurden 30 mL Salzsäure (5 M) zugetropft. Anschließend wurden 150 mL Wasser hinzugefügt, um weiterhin die Durchmischung der Suspension sicherzustellen. Zuerst bildete sich ein gelber Feststoff, welcher durch die weitere Zugabe von Salzsäure braun wurde (4). Dieser wurde mittels Vakuumfiltration abgetrennt und im Abzug getrocknet.

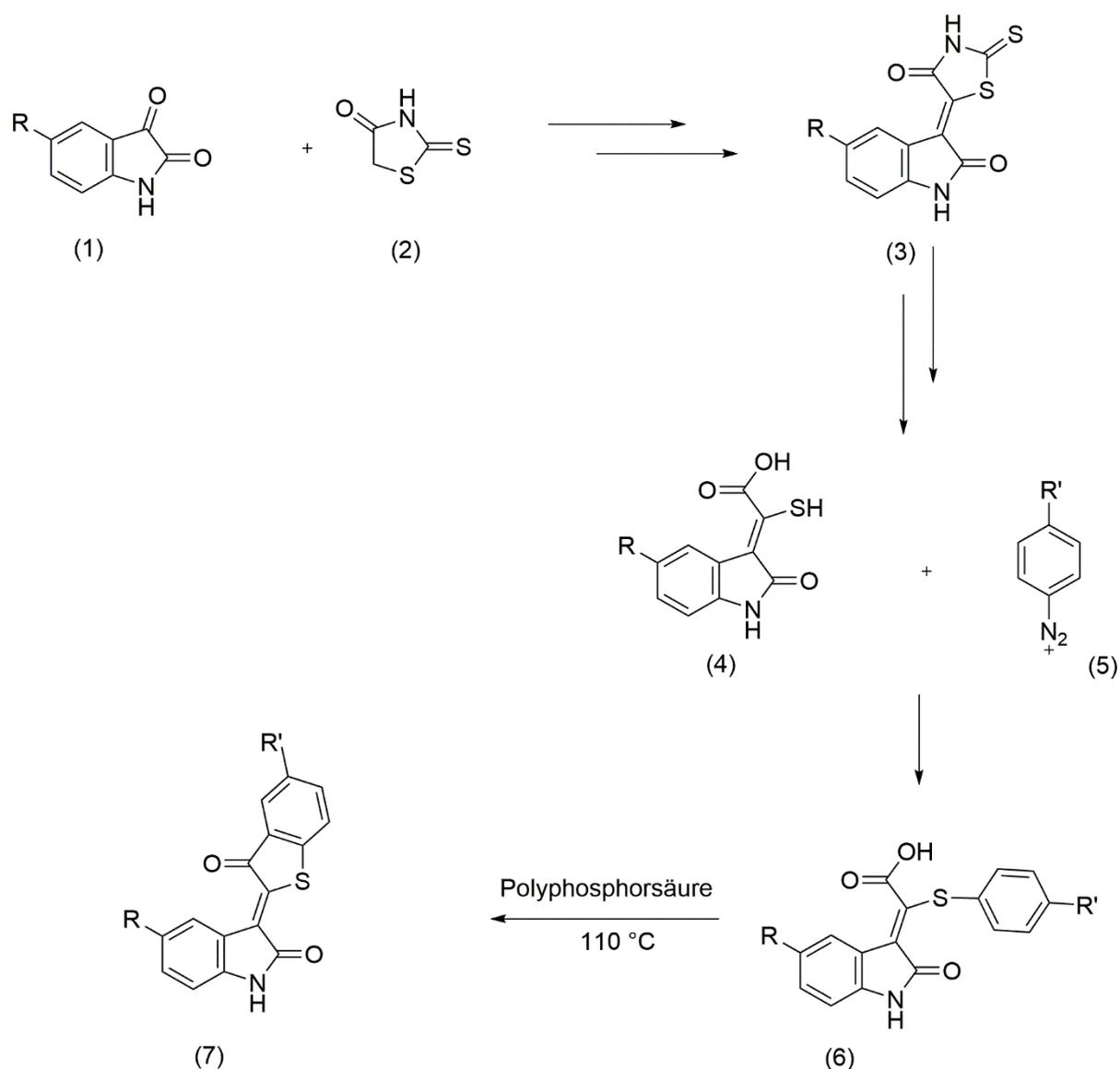


Abbildung 49: Allgemeiner Syntheseweg zur Herstellung von Thioindirubinen nach Riepl und Urmann [127] unter Beschriftung der wichtigsten Reaktionsschritte.

Die Diazotierung der Produkte (4) erfolgte mit den Benzen-Diazonium-Derivaten (5) (Substitution an Position 5'). Der erhaltene Feststoff wurde in 10 mL Natronlauge (2 M) gelöst. Anschließend wurden 60 mL Wasser zugegeben. Eine Zugabe der äquivalenten Menge des Salzes für die Diazotierung wurde bei 60 °C zur Lösung zugetropft und eine Stunde gerührt. Es galt darauf zu achten, dass die Reaktionslösung gut durchmischt wird. Weiterhin sollte der pH-Wert durch die Zugabe von Natronlauge bei einem Wert von 8-9 zu gehalten werden, da dieser Syntheseschritt für Nebenreaktionen anfällig ist. Das Nebenprodukt war ein unlöslicher Feststoff. Nach Abtrennung des Nebenproduktes durch Filtration wurde das Filtrat mittels Salzsäure (2 M) auf einen pH-Wert von 1 eingestellt, wodurch das Produkt ausgefallen ist. Dieses wurde filtriert und getrocknet.

Die abschließende Zyklisierung (6-7) erfolgte unter Zugabe von Polyphosphorsäure. Das Gemisch wurde im Ölbad für 2 Stunden bei 110 °C gerührt. Anschließend wurde das hochviskose, violette Gemisch auf 50 g Eis gegossen, eine Stunde gerührt und über einen Faltenfilter abfiltriert. Das Thioindirubin (7) wurde abschließend mit Hilfe einer Soxhlet Extraktion mit Aceton als Lösungsmittel aus dem Filterpapier extrahiert und teilweise noch säulenchromatographisch aufgereinigt.

Die Herstellung der Thioindirubine erfolgte nach der oben beschriebenen Synthesevorschrift.

5'-Thioindirubinessigsäure

Isatin (1) wurde mit Rhodanin (2) umgesetzt. Das erhaltene Produkt (3) wurde durch Hydrolyse umgesetzt. Das Produkt (4) (243 mg, 1,1 mmol) wurde mit 4-Carboxybenzoldiazoniumhydrogensulfat (5) (2,61 g, 19 mmol) umgesetzt. Das erhaltene Produkt (6) wurde mit PPA zum Produkt umgesetzt (56 mg, 0,17 mmol, 32 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,15 (s, 1H), 9,00 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 8,27 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 8,20 (dd, $J = 8,0, 2,1$ Hz, 1H), 7,48-7,38 (m, 2H), 7,09 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 189,24, 169,04, 166,22, 151,88, 143,90, 137,55, 136,25, 133,10, 129,14, 128,87, 128,18, 127,65, 126,74, 124,79, 121,94, 120,71, 110,40.

HRMS-TOF (m/z): 322,0172.

5'-Chlor-5-Methylthioindirubin

5-Methyl-Isatin (1) wurden mit Rhodanin (2) umgesetzt. Der erhaltene Feststoff (3) wurde durch Hydrolyse umgesetzt, wodurch das Methylderivat von (4) erhalten wurde. Ein Teil davon (259 mg, 1,1 mmol) wurde mit 4-Chlorbenzoldiazoniumhydrogensulfat (2,42 g, 19 mmol) umgesetzt. Ein Methylderivat von (6) mit einer Chlorgruppe als R' wurde erhalten, welches im Anschluss mit PPA umgesetzt wurde. Der erhaltene, rot-violette Feststoff wurde aufgereinigt (33 mg, 0,1 mmol, 9 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11,05 (s, 1H), 8,85 (s, 1H), 7,93-7,67 (m, 3H), 7,25 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 2,34 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 189,35, 169,63, 146,34, 145,59, 142,23, 136,29, 134,11, 133,43, 131,12, 131,04, 130,98, 128,84, 128,41, 126,78, 126,12, 110,66, 21,48.

HRMS-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: 328,0187.

5'-Methylthioindirubin

Isatin (1) wurde mit Rhodanin (2) umgesetzt. Das erhaltene Produkt (3) wurde durch Hydrolyse umgesetzt. Produkt (4) (243 mg, 1,1 mmol) wurde mit 4-Methylbenzoldiazoniumhydrogensulfat (5) (2,04 g, 19 mmol) umgesetzt. Das erhaltene Produkt (6) wurde mit PPA zum tiefroten Produkt umgesetzt und säulenchromatographisch über Kieselgel (Toluol/Aceton (50/50)) aufgereinigt (58 mg, 0,19 mmol, 24 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,11 (s, 1H), 9,02 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,68 (d, J = 1,7, 5,5 Hz, 1H), 7,64 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,57 (dd, J = 8,1, 1,8 Hz, 1H), 7,41 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,08 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 2,39 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190,05, 169,13, 144,01, 143,60, 138,63, 137,46, 136,01, 132,63, 128,94, 127,43, 127,24, 126,37, 124,23, 121,79, 120,77, 110,25, 20,35.

HRMS-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294,0578.

5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin

5-Fluor-Isatin (1) (5,14 g, 0,03 mol) wurden mit Rhodanin (2) (4,0 g, 0,03 mol) umgesetzt. Der erhaltene, schwarze, violette Feststoff (3) (7,7 g, 0,03 mol, 91 %) wurde durch Hydrolyse umgesetzt, wodurch das Fluorderivat von (4) (5,8 g, 0,024 mol, 80 %) als roter Feststoff erhalten wurde. Ein Teil dieses Fluorderivats von (4) (1,0 g, 0,0042 mol) wurden mit 4-Methylbenzoldiazoniumhydrogensulfat (1,47 g, 0,0095 mol) umgesetzt. Ein Fluorderivat von (6) mit einer Methylgruppe als R' (50,7 mg, 0,15 mmol, 3,7 %) wurde erhalten, wovon ein Teil (25,4 mg, 0,077 mmol) mit PPA (16,9 g, 0,17 mol) umgesetzt wurde. Der erhaltene, rot-violette Feststoff wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM/MeOH (90/10)) aufgereinigt, wodurch ein schwarz-violetter Feststoff erhalten wurde (11,3 mg, 0,036 mmol, 47 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,11 (s, 1H), 8,79 (dd, J = 10,5, 2,2 Hz, 1H), 7,66 (s, 1H), 7,62 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,56 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,26 (td, J = 8,8, 2,7 Hz, 1H), 6,93 (dd, J = 8,6, 4,7 Hz, 1H), 2,37 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190,06, 168,88, 158,29, 155,96, 143,65, 140,03, 139,75, 137,48, 136,02, 128,52, 126,33, 124,10, 121,11, 118,74, 113,86, 110,76, 20,12.

HRMS-TOF (m/z) $[\text{M}-\text{H}]^-$: 310,0388.

5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin

Ein Teil eines Chlorderivats von (4) (0,50 g, 2 mmol) wurden mit 4-Methylbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (0,4 g, 2 mmol) umgesetzt. Ein Chlorderivat von (6) mit einer Methylgruppe als R' (295,7 mg, 0,85 mmol, 44 %) wurde erhalten, wovon ein Teil (105,6 mg, 0,31 mmol) mit

PPA (17,5 g, 0,18 mol) umgesetzt wurde. Der erhaltene, rot-violette Feststoff wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM/MeOH (90/10)) aufgereinigt, wodurch ein tieferer Feststoff erhalten wurde (11,3 mg, 0,034 mmol, 11 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,25 (s, 1H), 9,06 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H), 7,71-7,69 (m, 1H), 7,65 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,61-7,57 (m, 1H), 7,47 (dd, $J = 8,3, 2,3$ Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 2,39 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) keine Daten verfügbar.

HRMS-TOF (m/z) [M-H] $^-$: 326,0041.

5'-Methyl-5-Bromthioindirubin

5-Brom-Isatin (1) (6,5 g, 0,03 mol) wurden mit Rhodanin (2) (4,0 g, 0,03 mol) umgesetzt. Der erhaltene, rot, violette Feststoff (3) (9,5 g, 0,03 mol, 92,6 %) wurde durch Hydrolyse umgesetzt, wodurch das Bromderivat von (4) (6,6 g, 0,022 mol, 73,6 %) als roter Feststoff erhalten wurde. Ein Teil dieses Bromderivats von (4) (1,4 g, 0,0047 mol) wurden mit 4-Methylbenzoldiazoniumhydrogensulfat (1,77 g, 0,011 mol) umgesetzt. Ein Bromderivat von (6) mit einer Methylgruppe als R' (184 mg, 0,47 mmol, 10,1 %) wurde erhalten, wovon ein Teil (92,1 mg, 0,31 mmol) mit PPA (12,8 g, 0,13 mol) umgesetzt wurde. Der erhaltene, rot-violette Feststoff wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM/MeOH (90/10)) aufgereinigt, wodurch ein tieferer Feststoff erhalten wurde (52,1 mg, 0,14 mmol, 43,4 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11,26 (s, 1H), 9,20 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,65 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,59 (dd, $J = 8,3, 2,0$ Hz, 2H), 6,93 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 2,39 (s, 3H).

^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190,70, 169,12, 144,58, 142,74, 140,93, 138,03, 136,86, 135,11, 130,04, 129,18, 127,36, 125,16, 122,96, 113,82, 112,72, 20,84.

HRMS-TOF (m/z) [M-H] $^-$: 369,9538.

5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin

5-Methoxy-Isatin (1) (5,0 g, 0,03 mol) wurden mit Rhodanin (2) (4,0 g, 0,03 mol) umgesetzt. Der erhaltene, schwarz, violette Feststoff (3) (10,1 g, 0,03 mol, 114,9 %) wurde durch Hydrolyse umgesetzt, wodurch das Methoxyderivat von (4) (7,5 g, 0,030 mol, 100 %) als braun-roter Feststoff erhalten wurde. Ein Teil dieses Methoxyderivats von (4) (1,0 g, 0,004 mol) wurden mit 4-Methylbenzoldiazoniumhydrogensulfat (1,47 g, 0,0095 mol) umgesetzt. Ein Methoxyderivat von (6) mit einer Methylgruppe als R' (83,2 mg, 0,24 mmol, 6,1 %) wurde erhalten, wovon ein Teil (40,3 mg, 0,12 mmol) mit PPA (19,2 g, 0,20 mol) umgesetzt wurde. Der erhaltene, rot-

violette Feststoff wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (DCM/MeOH (90/10)) aufgereinigt, wodurch ein schwarz-violetter Feststoff erhalten wurde (7,6 mg, 0,024 mmol, 19,6 %).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,91 (s, 1H), 8,72 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,72-7,65 (m, 1H), 7,61 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,55 (dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, 1H), 7,01 (dd, $J = 8,6, 2,7$ Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,80 (s, 3H), 2,37 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 190,72, 169,65, 154,95, 144,58, 139,34, 138,03 (2C), 136,56, 129,45, 128,31, 127,00, 124,73, 121,83, 119,03, 113,58, 111,11, 56,06, 20,87.

HRMS-TOF (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$: 324,0702.

8 Literaturverzeichnis

1. Nowossadeck, E., *Demografische Alterung und Folgen für das Gesundheitswesen*. GBE kompakt, 2012. **3**(2): p. 1-8.
2. Behl, C. and C. Ziegler, *Molekulare Mechanismen der Zellalterung und ihre Bedeutung für Alterserkrankungen des Menschen*. 2016: Springer-Verlag.
3. Statistisches Bundesamt, *14. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung*. 2018.
4. Grune, T., *Alterungsprozesse und Neurodegeneration: Ein Überblick*. 2014: Springer-Verlag.
5. Staudinger, U. and H. Häfner, *Was ist Alter (n)*. Neue Antworten auf eine scheinbar einfache Frage. . 2008: Springer-Verlag.
6. Christen, Y., *Oxidative stress and Alzheimer disease*. The American journal of clinical nutrition, 2000. **71**(2): p. 621S-629S.
7. Berninger, B. and M. Götz, *Nachwuchsförderung im Gehirn*. Gehirn&Geist, 2009. **7**(8): p. 58-63.
8. Hildebrand, M. and G. Goslow, *Vergleichende und funktionelle Anatomie der Wirbeltiere*. 2013: Springer-Verlag.
9. Luhmann, H.J., *Hirnpotentiale*. 2020: Springer-Verlag.
10. Beck, H., S. Anastasiadou, and C.M. zu Reckendorf, *Faszinierendes Gehirn: eine bebilderte Reise in die Welt der Nervenzellen*. 2017: Springer-Verlag.
11. Mu, Y. and F.H. Gage, *Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease*. Molecular neurodegeneration, 2011. **6**(1): p. 85.
12. Rekatsina, M., et al., *Pathophysiology and therapeutic perspectives of oxidative stress and neurodegenerative diseases: A narrative review*. Advances in therapy, 2020: p. 1-27.
13. Ludwig, M., *Facharztwissen Angiologie: zur Vorbereitung auf die Facharztprüfung*. 2019: Springer-Verlag.
14. Hummel, F., *Bedeutung neuronaler Netzwerke für die motorische Rehabilitation nach einem Schlaganfall*. Der Nervenarzt, 2017. **88**(8): p. 850-857.
15. Steiner, B., S.A. Wolf, and G. Kempermann, *Adult neurogenesis and neurodegenerative disease*. Future Medicine, 2006. **1**(1): p. 15-28.
16. Bischofberger, J. and C. Schmidt-Hieber, *Adulte Neurogenese im Hippokampus*. e-Neuroforum, 2006. **12**(3): p. 212-221.
17. Snyder, J.S. and M.R. Drew, *Functional neurogenesis over the years*. 2020, Elsevier.
18. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Neural Transplantation in Neurodegenerative Disease: Current Status and New Directions: Novartis Foundation Symposium, 2000. **231**: p. 220-241.
19. Kempermann, G., et al., *Neue Nervenzellen für das erwachsene Gehirn Adulte Neurogenese und Stammzellkonzepte in der neurologischen Forschung*. Der Nervenarzt, 1998. **69**(10): p. 851-857.
20. Karl, C., *Die Rolle des Doublecortin-Gens in neuronalen Vorläuferzellen während Migration und Neurogenese*. 2005: Universität Regensburg.
21. Allsopp, T.E., M.E. Bunnage, and P.V. Fish, *Small molecule modulation of stem cells in regenerative medicine: recent applications and future direction*. Medicinal Chemistry Communications, 2010. **1**(1): p. 16-29.
22. Corcoran, J. and M. Maden, *Nerve growth factor acts via retinoic acid synthesis to stimulate neurite outgrowth*. Nature neuroscience, 1999. **2**(4): p. 307-308.

23. Santarelli, L., et al., *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. Science, 2003. **301**(5634): p. 805-809.
24. Laux, G. and O. Dietmaier, *Psychopharmaka: übersichtlich und verständlich für Patienten, Angehörige und Profis in der Pflege*. 2013: Springer-Verlag.
25. Singh, R.H., K. Narsimhamurthy, and G. Singh, *Neuronutrient impact of Ayurvedic Rasayana therapy in brain aging*. Biogerontology, 2008. **9**(6): p. 369-374.
26. Schrott, E. and H.P.T. Ammon, *Heilpflanzen der ayurvedischen und der westlichen Medizin*. 2012, Springer-Verlag.
27. Kulkarni, R., K. Girish, and A. Kumar, *Nootropic herbs (Medhya Rasayana) in Ayurveda: an update*. Pharmacognosy reviews, 2012. **6**(12): p. 147.
28. Singh, H.K., *Brain enhancing ingredients from Ayurvedic medicine: quintessential example of Bacopa monniera, a narrative review*. Nutrients, 2013. **5**(2): p. 478-97.
29. Jeannin, J.-M., *Exotische Heilpflanzen (12)*. Schweizerische Zeitschrift für Ganzheitsmedizin, 2011. **23**(6): p. 326-326.
30. Uabundit, N., et al., *Cognitive enhancement and neuroprotective effects of Bacopa monnieri in Alzheimer's disease model*. Journal of ethnopharmacology, 2010. **127**(1): p. 26-31.
31. Kumar, S. and A.C. Mondal, *Neuroprotective, neurotrophic and anti-oxidative role of Bacopa monnieri on CUS induced model of depression in rat*. Neurochemical research, 2016. **41**(11): p. 3083-3094.
32. Hoessel, R., et al., *Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases*. Nature cell biology, 1999. **1**(1): p. 60-67.
33. Leclerc, S., et al., *Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(1): p. 251-260.
34. Marko, D., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells*. British journal of cancer, 2001. **84**(2): p. 283-289.
35. Lucas, F.R., et al., *Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium*. Journal of cell science, 1998. **111**(10): p. 1351-1361.
36. Manceur, A.P., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the differentiation and reduces the proliferation of adult human olfactory epithelium neural precursors*. Experimental cell research, 2011. **317**(15): p. 2086-2098.
37. Choi, D.W. and D.M. Hartley, *Neuroprotection by indolactam V and derivatives thereof*. 1994, Google Patents.
38. Chen, S., et al., *A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage*. Nature chemical biology, 2009. **5**(4): p. 258.
39. USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. 2020. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy).
40. Arya, V., *Indian medicinal plants Volume 1* Orient Longman. 1994, India.
41. Russo, A. and F. Borrelli, *Bacopa monniera, a reputed nootropic plant: an overview*. Phytomedicine, 2005. **12**(4): p. 305-17.
42. Qureshi, R. and G.R. Bhatti, *Ethnobotany of plants used by the Thari people of Nara Desert, Pakistan*. Fitoterapia, 2008. **79**(6): p. 468-473.

43. Nemetchek, M.D., et al., *The Ayurvedic plant Bacopa monnieri inhibits inflammatory pathways in the brain*. Journal of ethnopharmacology, 2017. **197**: p. 92-100.
44. Vollala, V.R., S. Upadhyaya, and S. Nayak, *Enhanced dendritic arborization of hippocampal CA3 neurons by Bacopa monniera extract treatment in adult rats*. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2011. **52**(3): p. 879-886.
45. Shinomol GK, M., Bharath MM *Exploring the role of "Brahmi" (Bacopa monnieri and Centella asiatica) in brain function and therapy*. Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery, 2011. **5**(1): p. 33-49.
46. Rajani, M., *Bacopa monnieri, a nootropic drug*, in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*. 2008, Springer-Verlag. p. 175-195.
47. Mathur, D., et al., *The molecular links of re-emerging therapy: a review of evidence of Brahmi (Bacopa monniera)*. Frontiers in pharmacology, 2016. **7**: p. 44.
48. Mathew, J., et al., *Bacopa monnieri and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits*. Fitoterapia, 2010. **81**(5): p. 315-322.
49. Podolak, I., A. Galanty, and D. Sobolewska, *Saponins as cytotoxic agents: a review*. Phytochemistry Reviews, 2010. **9**(3): p. 425-474.
50. Hostettmann, K. and A. Marston, *Saponins*. 1995: Cambridge University Press.
51. Muffler, K., et al., *Biotransformation of triterpenes*. Process Biochemistry, 2011. **46**(1): p. 1-15.
52. Kofler, L., *Die Saponine*. 1927: Springer-Verlag.
53. Waller, G.R. and K. Yamasaki, *Saponins used in food and agriculture*. Vol. 405. 1996: Plenum Press.
54. Sparg, S., M. Light, and J. Van Staden, *Biological activities and distribution of plant saponins*. Journal of ethnopharmacology, 2004. **94**(2-3): p. 219-243.
55. Reznicek, G. and J. Jurenitsch, *Der therapeutische Wert von Triterpensaponinen—Anspruch und Wirklichkeit*. Pharmazie in unserer Zeit, 1991. **20**(6): p. 278-281.
56. Schwarz, M.W., *Saponins*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000.
57. Rajan, K.E., J. Preethi, and H.K. Singh, *Molecular and functional characterization of Bacopa monniera: a retrospective review*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. **2015**.
58. Nuengchamng, N., S. Sookying, and K. Ingkaninan, *LC-ESI-QTOF-MS based screening and identification of isomeric jujubogenin and pseudojujubogenin aglycones in Bacopa monnieri extract*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016. **129**: p. 121-134.
59. Bhandari, P., N. Sendri, and S.B. Devidas, *Dammarane triterpenoid glycosides in Bacopa monnieri: A review on chemical diversity and bioactivity*. Phytochemistry, 2020. **172**: p. 112276.
60. Deepak, M. and A. Amit, *The need for establishing identities of 'bacoside A and B', the putative major bioactive saponins of Indian medicinal plant Bacopa monnieri*. Phytomedicine, 2004. **11**(2/3): p. 264.
61. Bhattacharya, S., et al., *Antioxidant activity of Bacopa monniera in rat frontal cortex, striatum and hippocampus*. Phytotherapy Research, 2000. **14**(3): p. 174-179.
62. Deepak, M. and A. Amit, *'Bacoside B'—the need remains for establishing identity*. Fitoterapia, 2013. **87**: p. 7-10.

63. Treutter, D., *Significance of flavonoids in plant resistance: a review*. Environmental Chemistry Letters, 2006. **4**(3): p. 147.
64. Packer, L. and H. Sies, *Flavonoids and other polyphenols*. 2001: Elsevier.
65. Tapas, A.R., D. Sakarkar, and R. Kakde, *Flavonoids as nutraceuticals: a review*. Tropical journal of Pharmaceutical research, 2008. **7**(3): p. 1089-1099.
66. Hänsel, R. and O. Sticher, *Pharmakognosie-phytopharmazie*. 2006: Springer-Verlag.
67. Bhandari, P., et al., *A rapid RP-HPTLC densitometry method for simultaneous determination of major flavonoids in important medicinal plants*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(13): p. 2092-2096.
68. Rajasekaran, A., et al., *Simultaneous estimation of luteolin and apigenin in methanol leaf extract of Bacopa monnieri Linn by HPLC*. Journal of Pharmaceutical Research International, 2014: p. 1629-1637.
69. Brown, J., *A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds*. Mutation Research, 1980. **75**(3): p. 243-277.
70. Wagner, V.H., *Flavonoid-Glykoside*, in *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 1974, Springer-Verlag. p. 153-216.
71. Schulte, K., G. Rücker, and M. El-Kersch, *Nicotin und 3-formyl-4-hydroxy-2H-pyran aus Herpestis monniera*. Phytochemistry, 1972. **11**(8): p. 2649-2651.
72. Nijveldt, R.J., et al., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. The American journal of clinical nutrition, 2001. **74**(4): p. 418-425.
73. Hill, R.A. and J.D. Connolly, *Triterpenoids*. Natural product reports, 2012. **29**(7): p. 780-818.
74. Ahmed, B. and A. Rahman, *Bacosterol, a new 13, 14-seco-steroid and bacosine, a new triterpene from Bacopa monniera*. Indian Journal of Chemistry Section B: Organic Chemistry including Medicinal Chemistry, 2000. **39B**: p. 620-625.
75. Viji, V., et al., *Betulinic acid isolated from Bacopa monniera (L.) Wettst suppresses lipopolysaccharide stimulated interleukin-6 production through modulation of nuclear factor-kappaB in peripheral blood mononuclear cells*. International Immunopharmacology, 2010. **10**(8): p. 843-9.
76. Stough, C., et al., *The chronic effects of an extract of Bacopa monniera (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects*. Psychopharmacology, 2001. **156**(4): p. 481-484.
77. Nathan, P.J., et al., *The acute effects of an extract of Bacopa monniera (Brahmi) on cognitive function in healthy normal subjects*. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, 2001. **16**(4): p. 345-351.
78. Roodenrys, S., et al., *Chronic effects of Brahmi (Bacopa monnieri) on human memory*. Neuropsychopharmacology, 2002. **27**(2): p. 279-81.
79. Raghav, S., et al., *Randomized controlled trial of standardized Bacopa monniera extract in age-associated memory impairment*. Indian Journal of Psychiatry, 2006. **48**(4): p. 238.
80. Stough, C., et al., *Examining the nootropic effects of a special extract of Bacopa monniera on human cognitive functioning: 90 day double-blind placebo-controlled randomized trial*. Phytotherapy Research, 2008. **22**(12): p. 1629-1634.

81. Barbhaiya, H.C., et al., *Efficacy and tolerability of BacoMind on memory improvement in elderly participants—a double blind placebo controlled study*. Journal of Pharmacology and Toxicology, 2008. **3**(6): p. 425-34.
82. Calabrese, C., et al., *Effects of a standardized Bacopa monnieri extract on cognitive performance, anxiety, and depression in the elderly: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. The journal of alternative and complementary medicine, 2008. **14**(6): p. 707-713.
83. Morgan, A. and J. Stevens, *Does Bacopa monnieri improve memory performance in older persons? Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial*. The journal of alternative and complementary medicine, 2010. **16**(7): p. 753-759.
84. Peth-Nui, T., et al., *Effects of 12-week Bacopa monnieri consumption on attention, cognitive processing, working memory, and functions of both cholinergic and monoaminergic systems in healthy elderly volunteers*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012. **2012**.
85. Sathyanarayanan, V., et al., *Brahmi for the better? New findings challenging cognition and anti-anxiety effects of Brahmi (Bacopa monniera) in healthy adults*. Psychopharmacology, 2013. **227**(2): p. 299-306.
86. Downey, L.A., et al., *An acute, double-blind, placebo-controlled crossover study of 320 mg and 640 mg doses of a special extract of Bacopa monnieri (CDRI 08) on sustained cognitive performance*. Phytotherapy Research, 2013. **27**(9): p. 1407-1413.
87. Benson, S., et al., *An acute, double-blind, placebo-controlled cross-over study of 320 mg and 640 mg doses of Bacopa monnieri (CDRI 08) on multitasking stress reactivity and mood*. Phytotherapy Research, 2014. **28**(4): p. 551-559.
88. Kumar, N., et al., *Efficacy of standardized extract of Bacopa monnieri (Bacognize®) on cognitive functions of medical students: a six-week, randomized placebo-controlled trial*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016. **2016**.
89. Gerontakos, S., D. Casteleijn, and J. Wardle, *Clinician perspectives and understanding of the adaptogenic concept: A focus group study with Naturopaths and Western Herbalists*. Integrative Medicine Research, 2020: p. 100433.
90. Anbarasi, K., et al., *Creatine kinase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: protective effect of Bacoside A*. Vascular pharmacology, 2005. **42**(2): p. 57-61.
91. Anbarasi, K., et al., *Effect of bacoside A on membrane-bound ATPases in the brain of rats exposed to cigarette smoke*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2005. **19**(1): p. 59-65.
92. Anbarasi, K., G. Vani, and C.S.S. Devi, *Protective effect of bacoside A on cigarette smoking-induced brain mitochondrial dysfunction in rats*. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology, 2005. **24**(3).
93. Anbarasi, K., et al., *Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats*. Life sciences, 2006. **78**(12): p. 1378-1384.
94. Jyoti, A. and D. Sharma, *Neuroprotective role of Bacopa monniera extract against aluminium-induced oxidative stress in the hippocampus of rat brain*. Neurotoxicology, 2006. **27**(4): p. 451-457.
95. Jyoti, A., P. Sethi, and D. Sharma, *Bacopa monniera prevents from aluminium neurotoxicity in the cerebral cortex of rat brain*. Journal of ethnopharmacology, 2007. **111**(1): p. 56-62.

96. Kapoor, R., S. Srivastava, and P. Kakkar, *Bacopa monnieri modulates antioxidant responses in brain and kidney of diabetic rats*. Environmental toxicology and pharmacology, 2009. **27**(1): p. 62-69.
97. Khan, R., A. Krishnakumar, and C. Paulose, *Decreased glutamate receptor binding and NMDA R1 gene expression in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats: neuroprotective role of Bacopa monnieri extract*. Epilepsy & Behavior, 2008. **12**(1): p. 54-60.
98. Krishnakumar, A., et al., *Down-regulation of cerebellar 5-HT_{2C} receptors in pilocarpine-induced epilepsy in rats: therapeutic role of Bacopa monnieri extract*. Journal of the neurological sciences, 2009. **284**(1-2): p. 124-128.
99. Saraf, M.K., S. Prabhakar, and A. Anand, *Neuroprotective effect of Bacopa monnieri on ischemia induced brain injury*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2010. **97**(2): p. 192-197.
100. Shinomol, G.K., *Bacopa monnieri modulates endogenous cytoplasmic and mitochondrial oxidative markers in prepubertal mice brain*. Phytomedicine, 2011. **18**(4): p. 317-326.
101. Mathew, J., et al., *Behavioral deficit and decreased GABA receptor functional regulation in the hippocampus of epileptic rats: effect of Bacopa monnieri*. Neurochemical research, 2011. **36**(1): p. 7-16.
102. Mathew, J., et al., *Decreased GABA receptor in the cerebral cortex of epileptic rats: effect of Bacopa monnieri and Bacoside-A*. Journal of biomedical science, 2012. **19**(1): p. 25.
103. Shobana, C., R.R. Kumar, and T. Sumathi, *Alcoholic extract of Bacopa monnieri Linn. protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study*. Cellular and molecular neurobiology, 2012. **32**(7): p. 1099-1112.
104. Sumathi, T., et al., *Protective effect of Bacopa monnieri on methyl mercury-induced oxidative stress in cerebellum of rats*. Cellular and molecular neurobiology, 2012. **32**(6): p. 979-987.
105. Shinomol, G.K., R.B. Mythri, and M.S. Bharath, *Bacopa monnieri extract offsets rotenone-induced cytotoxicity in dopaminergic cells and oxidative impairments in mice brain*. Cellular and molecular neurobiology, 2012. **32**(3): p. 455-465.
106. Shinomol, G.K. and M.S. Bharath, *Neuromodulatory propensity of Bacopa monnieri leaf extract against 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress: in vitro and in vivo evidences*. Neurotoxicity research, 2012. **22**(2): p. 102-114.
107. Rastogi, M., et al., *Prevention of age-associated neurodegeneration and promotion of healthy brain ageing in female Wistar rats by long term use of bacosides*. Biogerontology, 2012. **13**(2): p. 183-195.
108. Thomas, R.B., et al., *Neuroprotective potential of Bacopa monnieri and Bacoside A against dopamine receptor dysfunction in the cerebral cortex of neonatal hypoglycaemic rats*. Cellular and molecular neurobiology, 2013. **33**(8): p. 1065-1074.
109. Priyanka, H.P., et al., *Bacopa monnieri and l-deprenyl differentially enhance the activities of antioxidant enzymes and the expression of tyrosine hydroxylase and nerve growth factor via ERK 1/2 and NF- κ B pathways in the spleen of female Wistar rats*. Neurochemical research, 2013. **38**(1): p. 141-152.
110. Shinomol, G.K., et al., *Prophylaxis with Bacopa monnieri attenuates acrylamide induced neurotoxicity and oxidative damage via elevated antioxidant function*. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 2013. **13**(1): p. 3-12.

111. Verma, P., P. Singh, and B.S. Gandhi, *Neuromodulatory role of Bacopa monnieri on oxidative stress induced by postnatal exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE-209) in neonate and young female mice*. Iranian journal of basic medical sciences, 2014. **17**(4): p. 307.
112. Nannepaga, J.S., et al., *Neuroprotective effects of bacopa monniera whole-plant extract against aluminum-induced hippocampus damage in rats: evidence from electron microscopic images*. The Chinese journal of physiology, 2014. **57**(5): p. 279-285.
113. Banerjee, R., et al., *Chronic administration of bacopa monniera increases BDNF protein and mRNA expressions: a study in chronic unpredictable stress induced animal model of depression*. Psychiatry investigation, 2014. **11**(3): p. 297.
114. Mondal, P. and S.K. Trigun, *Bacopa monnieri extract (CDRI-08) modulates the NMDA receptor subunits and nNOS-apoptosis axis in cerebellum of hepatic encephalopathy rats*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. **2015**.
115. Pandey, S.P., H.K. Singh, and S. Prasad, *Alterations in hippocampal oxidative stress, expression of AMPA receptor GluR2 subunit and associated spatial memory loss by Bacopa monnieri extract (CDRI-08) in streptozotocin-induced diabetes mellitus type 2 mice*. PLoS One, 2015. **10**(7).
116. Singh, B., et al., *Role of ethanolic extract of Bacopa monnieri against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) induced mice model via inhibition of apoptotic pathways of dopaminergic neurons*. Brain research bulletin, 2017. **135**: p. 120-128.
117. Pandey, S.P. and S. Prasad, *Diabetes mellitus type 2 induces brain aging and memory impairment in mice: neuroprotective effects of bacopa monnieri extract*, in *Topics in Biomedical Gerontology*. 2017, Springer-Verlag. p. 335-355.
118. Waly, N.E., N.M. Aborehab, and M.H. El Bishbishy, *Chemical fingerprint of Bacopa monnieri L. and Rosmarinus officinalis L. and their neuroprotective activity against Alzheimers disease in rat models putative modulation via cholinergic and monoaminergic pathways*. Journal of Medicinal Plants Research, 2019. **13**(11): p. 252-268.
119. Saini, N., D. Singh, and R. Sandhir, *Neuroprotective effects of Bacopa monnieri in experimental model of dementia*. Neurochemical research, 2012. **37**(9): p. 1928-1937.
120. Saini, N., D. Singh, and R. Sandhir, *Bacopa monnieri prevents colchicine-induced dementia by anti-inflammatory action*. Metabolic brain disease, 2019. **34**(2): p. 505-518.
121. Singh, B., et al., *Neuroprotective effects of Bacopa monnieri in Parkinson's disease model*. Metabolic brain disease, 2020. **35**(3): p. 517-525.
122. Micheli, L., et al., *Bacopa monnieri as augmentation therapy in the treatment of anhedonia, preclinical and clinical evaluation*. Phytotherapy Research, 2020.
123. Gaboriaud-Kolar, N., K. Vougiopoulou, and A.-L. Skaltsounis, *Indirubin derivatives: A patent review (2010–present)*. Expert opinion on therapeutic patents, 2015. **25**(5): p. 583-593.
124. Hu, Z., et al., *Rapid identification and verification of indirubin-containing medicinal plants*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2015. **2015**.
125. Maier, W., B. Schumann, and D. Gröger, *Biosynthesis of indoxyl derivatives in Isatis tinctoria and Polygonum tinctorium*. Phytochemistry, 1990. **29**(3): p. 817-819.

126. Eisenbrand, G., et al., *Molecular mechanisms of indirubin and its derivatives: novel anticancer molecules with their origin in traditional Chinese phytomedicine*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2004. **130**(11): p. 627-635.
127. Riepl, H.M. and C. Urmann, *Improved Synthesis of Indirubin Derivatives by Sequential Build-Up of the Indoxyl Unit: First Preparation of Fluorescent Indirubins*. Helvetica Chimica Acta, 2012. **95**(8): p. 1461-1477.
128. De Landsheere, B., *Effect of indirubin on white blood cell count of the guinea pig*. Experientia, 1951. **7**(8): p. 307-308.
129. Meijer, L., et al., *GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins*. Chemistry & biology, 2003. **10**(12): p. 1255-1266.
130. Polychronopoulos, P., et al., *Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases*. Journal of medicinal chemistry, 2004. **47**(4): p. 935-946.
131. Kunikata, T., et al., *Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity*. European journal of pharmacology, 2000. **410**(1): p. 93-100.
132. Hsieh, W.-L., et al., *Indirubin, an acting component of indigo naturalis, inhibits EGFR activation and EGF-induced CDC25B gene expression in epidermal keratinocytes*. Journal of dermatological science, 2012. **67**(2): p. 140-146.
133. Kunz, M., et al., *Synthesis of thia-analogous indirubin N-glycosides and their influence on melanoma cell growth and apoptosis*. ChemMedChem, 2010. **5**(4): p. 534-539.
134. Awakawa, T. and I. Abe, *Biosynthesis of the teleocidin-type terpenoid indole alkaloids*. Organic & biomolecular chemistry, 2018. **16**(26): p. 4746-4752.
135. Fujiki, H. and T. Sugimura, *New classes of tumor promoters: teleocidin, aplysiatoxin, and palytoxin*, in *Advances in cancer research*. 1987, Elsevier. p. 223-264.
136. Irie, K., et al., *Biosynthesis of indole alkaloid tumor promoters teleocidins (I) possible biosynthetic pathway of the monoterpene moieties of teleocidins*. Tetrahedron, 1990. **46**(8): p. 2773-2788.
137. Haynes-Smith, J., I. Diaz, and K.L. Billingsley, *Modular Total Synthesis of Protein Kinase C Activator (-)-Indolactam V*. Organic letters, 2016. **18**(9): p. 2008-2011.
138. Bieringer, S., et al., *Isolation of Lyngbyatoxin and other Teleocidin species from, Streptomyces Blastmyceticum" culture*. Planta Medica, 2019. **85**(18): p. P-459.
139. Fujiki, H., et al., *Indole alkaloids: dihydroteleocidin B, teleocidin, and lyngbyatoxin A as members of a new class of tumor promoters*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(6): p. 3872-3876.
140. Fujiki, H., et al., *Activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) by new classes of tumor promoters: teleocidin and debromoaplysiatoxin*. Biochemical and biophysical research communications, 1984. **120**(2): p. 339-343.
141. Koshimizu, K., et al., *Structure-activity relationship in the induction of Epstein-Barr virus by teleocidin derivatives*. International journal of cancer, 1985. **36**(4): p. 485-488.
142. Lange, C., et al., *Small molecule GSK-3 inhibitors increase neurogenesis of human neural progenitor cells*. Neuroscience letters, 2011. **488**(1): p. 36-40.
143. Shahid, M., et al., *A bacosides containing Bacopa monnieri extract alleviates allodynia and hyperalgesia in the chronic constriction injury model of*

- neuropathic pain in rats*. BMC complementary and alternative medicine, 2017. **17**(1): p. 293.
144. Shah, M., Y.R. Behara, and B. Jagadeesh, *Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of aqueous and hydroalcoholic extract of Bacopa monnieri Linn*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2012. **3**(9): p. 3418.
145. Sairam, K., et al., *Antidepressant activity of standardized extract of Bacopa monniera in experimental models of depression in rats*. Phytomedicine, 2002. **9**(3): p. 207-211.
146. Russo, A., et al., *Nitric oxide-related toxicity in cultured astrocytes: effect of Bacopa monniera*. Life Sciences, 2003. **73**(12): p. 1517-1526.
147. Russo, A., et al., *Free radical scavenging capacity and protective effect of Bacopa monniera L. on DNA damage*. Phytotherapy Research, 2003. **17**(8): p. 870-875.
148. Hossain, H., *Evaluation of antinociceptive and antioxidant activities of whole plant extract of Bacopa monniera*. Research Journal of Medicinal Plant, 2012. **6**(8): p. 607-614.
149. Majinda, R.R., *Extraction and isolation of saponins*, in *Natural products isolation*. 2012, Springer-Verlag. p. 415-426.
150. Cheok, C.Y., H.A.K. Salman, and R. Sulaiman, *Extraction and quantification of saponins: A review*. Food Research International, 2014. **59**: p. 16-40.
151. Jones, W.P. and A.D. Kinghorn, *Extraction of plant secondary metabolites*, in *Natural products isolation*. 2006, Springer-Verlag. p. 323-351.
152. Pohanka, M., *Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current view*. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc, 2016. **160**(1).
153. Bhandari, P., et al., *Silica-based monolithic column with evaporative light scattering detector for HPLC analysis of bacosides and apigenin in Bacopa monnieri*. Journal of separation science, 2009. **32**(15-16): p. 2812-2818.
154. Phrompittayarat, W., et al., *Influence of seasons, different plant parts, and plant growth stages on saponin quantity and distribution in Bacopa monnieri*. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 2011. **33**(2).
155. Phrompittayarat, W., et al., *Comparison of various extraction methods of Bacopa monnieri*. Naresuan university journal: science and technology 2013. **15**(1): p. 29-34.
156. Chaudhuri, P., et al., *Phytotoxic and antimicrobial constituents of Bacopa monnieri and Holmskioldia sanguinea*. Phytotherapy Research, 2004. **18**(2): p. 114-117.
157. Pham, H.T.N., et al., *Bacopa monnieri (L.) Wettst. Extract Improves Memory Performance via Promotion of Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus of Adolescent Mice*. International journal of molecular sciences, 2020. **21**(9): p. 3365.
158. Huie, C.W., *A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2002. **373**(1-2): p. 23-30.
159. Chatterjee, M., P. Verma, and G. Palit, *Comparative evaluation of Bacopa monniera and Panax quinquefolium in experimental anxiety and depressive models in mice*. Indian Journal of Experimental Biology 2010. **48**: p. 306-313.

160. Gokaraju, G., et al., *Process for producing enriched fractions containing upto 100% of bacoside a and bacoside b from plant materials of bacopa species*. 2005, Google Patents.
161. Negi, J.S., et al., *High-performance liquid chromatography analysis of plant saponins: An update 2005-2010*. *Pharmacognosy reviews*, 2011. **5**(10): p. 155.
162. Murthy, P.B.S., et al., *Estimation of twelve bacopa saponins in Bacopa monnieri extracts and formulations by high-performance liquid chromatography*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2006. **54**(6): p. 907-911.
163. Phrompittayarat, W., et al., *Determination of pseudojubilogenin glycosides from brahmi based on immunoassay using a monoclonal antibody against bacoside I*. *Phytochemical Analysis*, 2007. **18**(5): p. 411-418.
164. Poole, C.F., *New trends in solid-phase extraction*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003. **22**(6): p. 362-373.
165. Hennion, M.-C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. *Journal of chromatography A*, 1999. **856**(1-2): p. 3-54.
166. Oleszek, W., *Solid-phase extraction-fractionation of alfalfa saponins*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1988. **44**(1): p. 43-49.
167. Dehmoradkhani, K.R., et al., *Flavonoids from the aerial parts of Artemisia biennis Willd*. *Pharmaceutical Sciences*, 2019. **25**(4): p. 364-368.
168. Ritter, S., et al., *Where is Bacosine in commercially available Bacopa monnieri?* *Planta medica*, 2020. **86**(08): p. 565-570.
169. Kishore, L., N. Kaur, and R. Singh, *Bacosine isolated from aerial parts of Bacopa monnieri improves the neuronal dysfunction in Streptozotocin-induced diabetic neuropathy*. *Journal of Functional Foods*, 2017. **34**: p. 237-247.
170. Ghosh, T., T.K. Maity, and J. Singh, *Antihyperglycemic activity of bacosine, a triterpene from Bacopa monnieri, in alloxan-induced diabetic rats*. *Planta Medica*, 2011. **77**(08): p. 804-808.
171. Vohora, S., et al., *Analgesic activity of bacosine, a new triterpene isolated from Bacopa monnieri*. *Fitoterapia*, 1997. **68**(4): p. 361-365.
172. Moghaddam, M.G., F.B.H. Ahmad, and A. Samzadeh-Kermani, *Biological activity of betulinic acid: a review*. *Pharmacology & Pharmacy*, 2012. **3**(02): p. 119-123.
173. Yogeewari, P. and D. Sriram, *Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties*. *Current Medicinal Chemistry*, 2005. **12**(6): p. 657-666.
174. Ríos, J.L. and S. Manez, *New pharmacological opportunities for betulinic acid*. *Planta Medica*, 2018. **84**(01): p. 8-19.
175. Jain, P.K., et al., *Pharmacognostic and pharmacological aspect of Bacopa monnieri: A review*. *Innovare Journal of Ayurvedic Science*, 2016. **8**: p. 7-11.
176. Shefin, B., S. Sreekumar, and C. Biju, *Identification of lead molecules with anti-hepatitis B activity in Bacopa monnieri (L.) Wettst. and Cassia fistula L. through in silico method*. 2016, *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. p. 16-21.
177. Ganjewala, D. and A.K. Srivastava, *Recent progress on chemical composition and bioactivities of Bacopa monnieri (Linn.) a plant of Ayurveda*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2011. **5**: p. 102-108.
178. Rai, K., et al., *Bacopa Monnieri: A Wonder Drug Changing Fortune of People*. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 2017. **5**(2): p. 127-132.

179. Ghosh, S., *Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases*. Proceedings of the Indian National Science Academy, 2016. **82**(4): p. 1189-1210.
180. Zhang, Y., et al., *Determination of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese medicinal plants using HPLC with PAH polymeric C18*. Pharmacognosy Magazine, 2013. **9**(Suppl1): p. 19-24.
181. Ayatollahi, A.M., et al., *Pentacyclic triterpenes in Euphorbia microsciadia with their T-cell proliferation activity*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2011. **10**(2): p. 287-294.
182. Khaliq, S., F.-J. Volk, and A.W. Frahm, *Phytochemical investigation of Perovskia abrotanoides*. Planta Medica, 2007. **73**(01): p. 77-83.
183. Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 2005: Georg Thieme Verlag.
184. Ghosh, T., et al., *Antidiabetic and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of Bacopa monnieri Linn. aerial parts: a possible mechanism of action*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2008. **7**(1): p. 61-68.
185. Kaundal, M., R. Deshmukh, and M. Akhtar, *Protective effect of betulinic acid against intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and neuronal damage in rats: Possible neurotransmitters and neuroinflammatory mechanism*. Pharmacological Reports, 2018. **70**(3): p. 540-548.
186. Mishra, S.R., et al., *In Vitro Analysis of Bacosine as Novel Therapeutic Agent for Murine Breast Cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2019. **89**(2): p. 511-515.
187. Nicolaou, K. and S.A. Snyder, *Die Jagd auf Moleküle, die nie existiert haben: Falsch zugeordnete Naturstoffstrukturen und die Rolle der chemischen Synthese in der modernen Strukturaufklärung*. Angewandte Chemie, 2005. **117**(7): p. 1036-1069.
188. Peña-Rodríguez, L.M., et al., *Isotopologue profiling of triterpene formation under physiological conditions. Biosynthesis of lupeol-3-(3'-R-hydroxy)-stearate in Pentalinon andrieuxii*. The Journal of Organic Chemistry, 2014. **79**(7): p. 2864-2873.
189. La Rosa, C., R. Parolisi, and L. Bonfanti, *Brain structural plasticity: From adult neurogenesis to immature neurons*. Frontiers in Neuroscience, 2020. **14**: p. 75.
190. Durante, M.A., et al., *Single-cell analysis of olfactory neurogenesis and differentiation in adult humans*. Nature neuroscience, 2020. **23**(3): p. 323-326.
191. Abbott, L.C. and F. Nigussie, *Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus*. Anatomia, Histologia, Embryologia, 2020. **49**(1): p. 3-16.
192. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-1438.
193. Kempermann, G., et al., *Milestones of neuronal development in the adult hippocampus*. Trends in neurosciences, 2004. **27**(8): p. 447-452.
194. Spalding, K.L., et al., *Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1219-1227.
195. Anacker, C., et al., *Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(5): p. 872-883.
196. Kwon, H.J., et al., *Bacopa monnieri extract improves novel object recognition, cell proliferation, neuroblast differentiation, brain-derived neurotrophic factor, and phosphorylation of cAMP response element-binding protein in the dentate gyrus*. Laboratory animal research, 2018. **34**(4): p. 239-247.

197. Kaundal, M., et al., *Betulinic acid, a natural PDE inhibitor restores hippocampal cAMP/cGMP and BDNF, improve cerebral blood flow and recover memory deficits in permanent BCCAO induced vascular dementia in rats*. European journal of pharmacology, 2018. **832**: p. 56-66.
198. Galgon, T., W. Wohlrab, and B. Dräger, *Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes*. Experimental dermatology, 2005. **14**(10): p. 736-743.
199. Koestenbauer, S., N. Zech, and G. Dohr, *Trans-Differenzierung von adulten Stammzellen-Ist eine Veränderung in Richtung naiverer Zellen möglich?* Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, 2006. **3**(5): p. 324-330.
200. Lo, Y.-C., et al., *Betulinic acid stimulates the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells: involvement of BMP/Runx2 and β -catenin signals*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(11): p. 6643-6649.
201. Boeckx, C. and A. Benítez-Burraco, *Osteogenesis and neurogenesis: a robust link also for language evolution*. Frontiers in cellular neuroscience, 2015. **9**: p. 291.
202. Malishev, R., et al., *Bacoside-A, an Indian traditional-medicine substance, inhibits β -amyloid cytotoxicity, fibrillation, and membrane interactions*. ACS chemical neuroscience, 2017. **8**(4): p. 884-891.
203. He, X., et al., *Effects of total saponins of Panax notoginseng on immature neuroblasts in the adult olfactory bulb following global cerebral ischemia/reperfusion*. Neural regeneration research, 2015. **10**(9): p. 1450.
204. Si, Y., et al., *Effects of Panax notoginseng saponins on proliferation and differentiation of rat embryonic cortical neural stem cells*. Journal of the Chinese Medical Association, 2016. **79**(5): p. 256-263.
205. Taupin, P., *Apigenin and related compounds stimulate adult neurogenesis: Mars, Inc., the Salk Institute for Biological Studies: WO2008147483*. Expert opinion on therapeutic patents, 2009. **19**(4): p. 523-527.
206. Ugarova, N., *Luciferase of Luciola mingrelica fireflies. Kinetics and regulation mechanism*. Journal of bioluminescence and chemiluminescence, 1989. **4**(1): p. 406-418.
207. Suzuki, K., et al., *Indirubin, a Chinese anti-leukaemia drug, promotes neutrophilic differentiation of human myelocytic leukaemia HL-60 cells*. British journal of haematology, 2005. **130**(5): p. 681-690.
208. Ding, S., et al., *Synthetic small molecules that control stem cell fate*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(13): p. 7632-7637.
209. Zhang, L., et al., *The Wnt/ β -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis*. European Journal of Neuroscience, 2011. **33**(1): p. 1-8.
210. Amabile, G., et al., *The Aurora B kinase activity is required for the maintenance of the differentiated state of murine myoblasts*. Cell Death & Differentiation, 2009. **16**(2): p. 321-330.
211. Urmann, C., *Gewinnung von Prenylflavonoiden aus Humulus lupulus L. und ihr Effekt auf Differenzierung und Protektion neuronaler Zellkulturen*. 2012, Technische Universität München.
212. Nakayasu, M., et al., *Teleocidin, lyngbyatoxin A and their hydrogenated derivatives, possible tumor promoters, induce terminal differentiation in HL-60 cells*. Cancer letters, 1981. **12**(4): p. 271-277.

213. Oberbauer, E., et al., *Chroman-like cyclic prenylflavonoids promote neuronal differentiation and neurite outgrowth and are neuroprotective*. The Journal of nutritional biochemistry, 2013. **24**(11): p. 1953-1962.

9 Anhang

9.1 Abbildungen und Tabellen

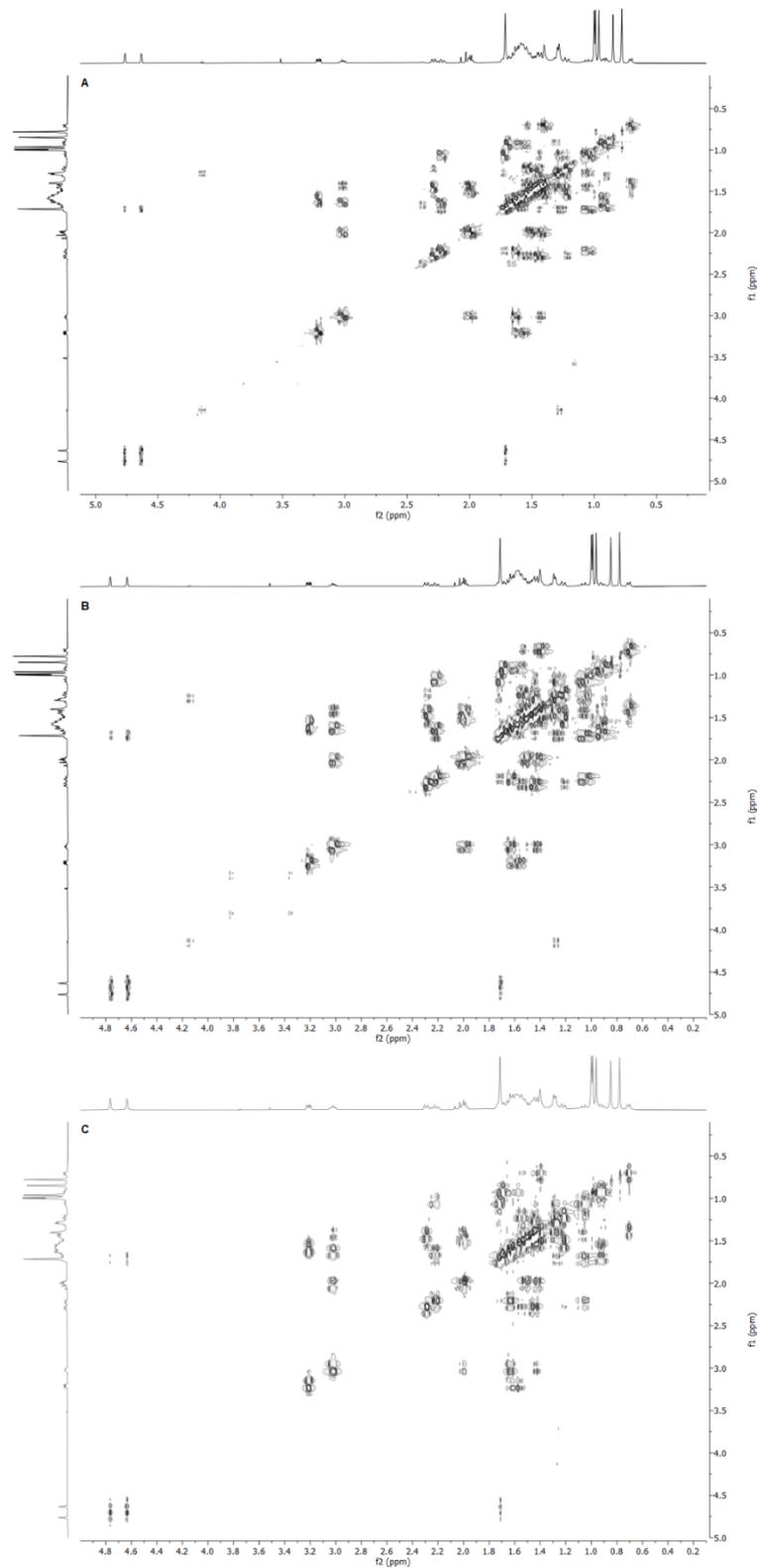


Abbildung 50: $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus *B. monnieri* (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].

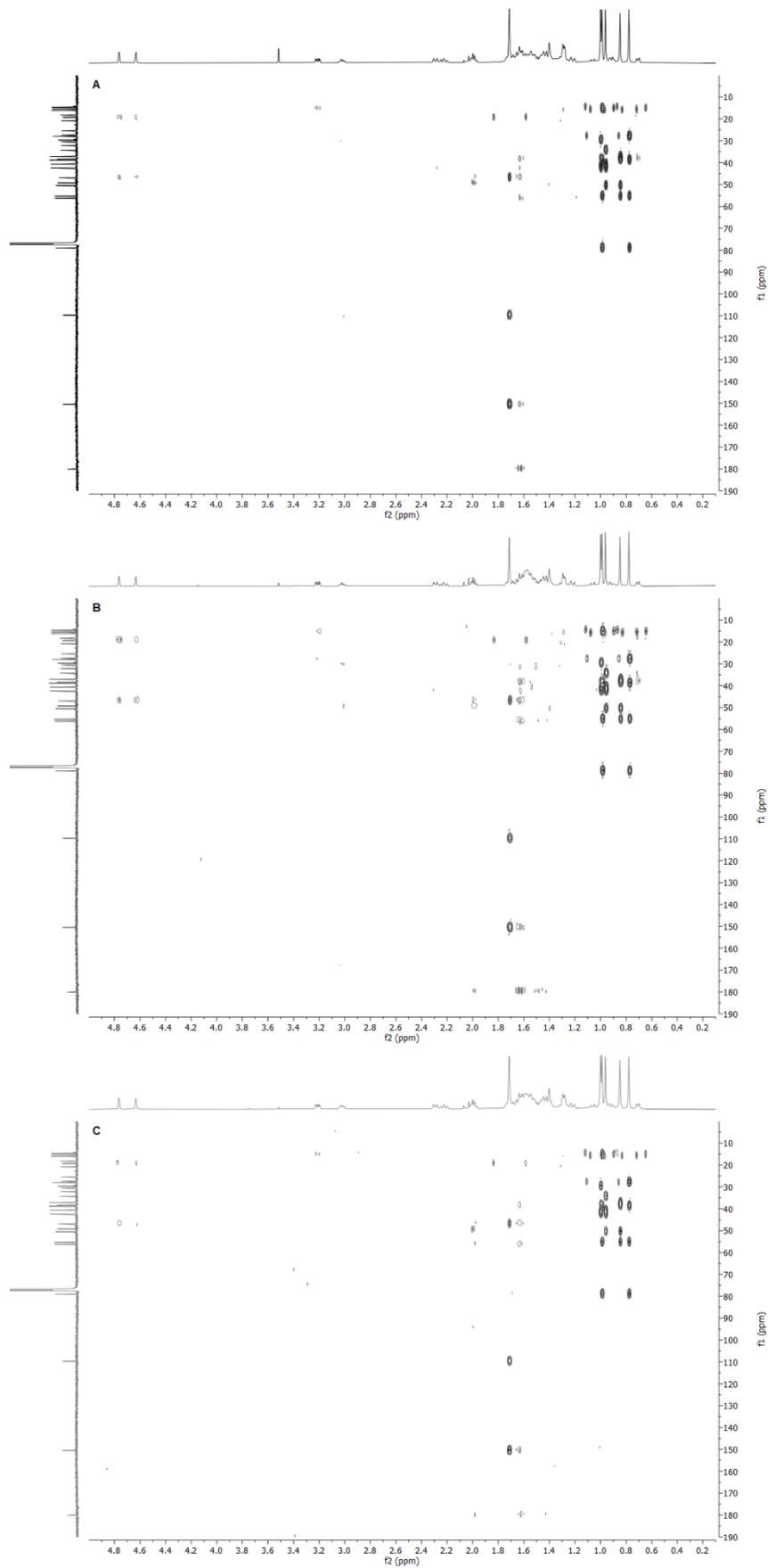


Abbildung 51: ^1H , ^{13}C HMBC Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus *B. monnieri* (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].

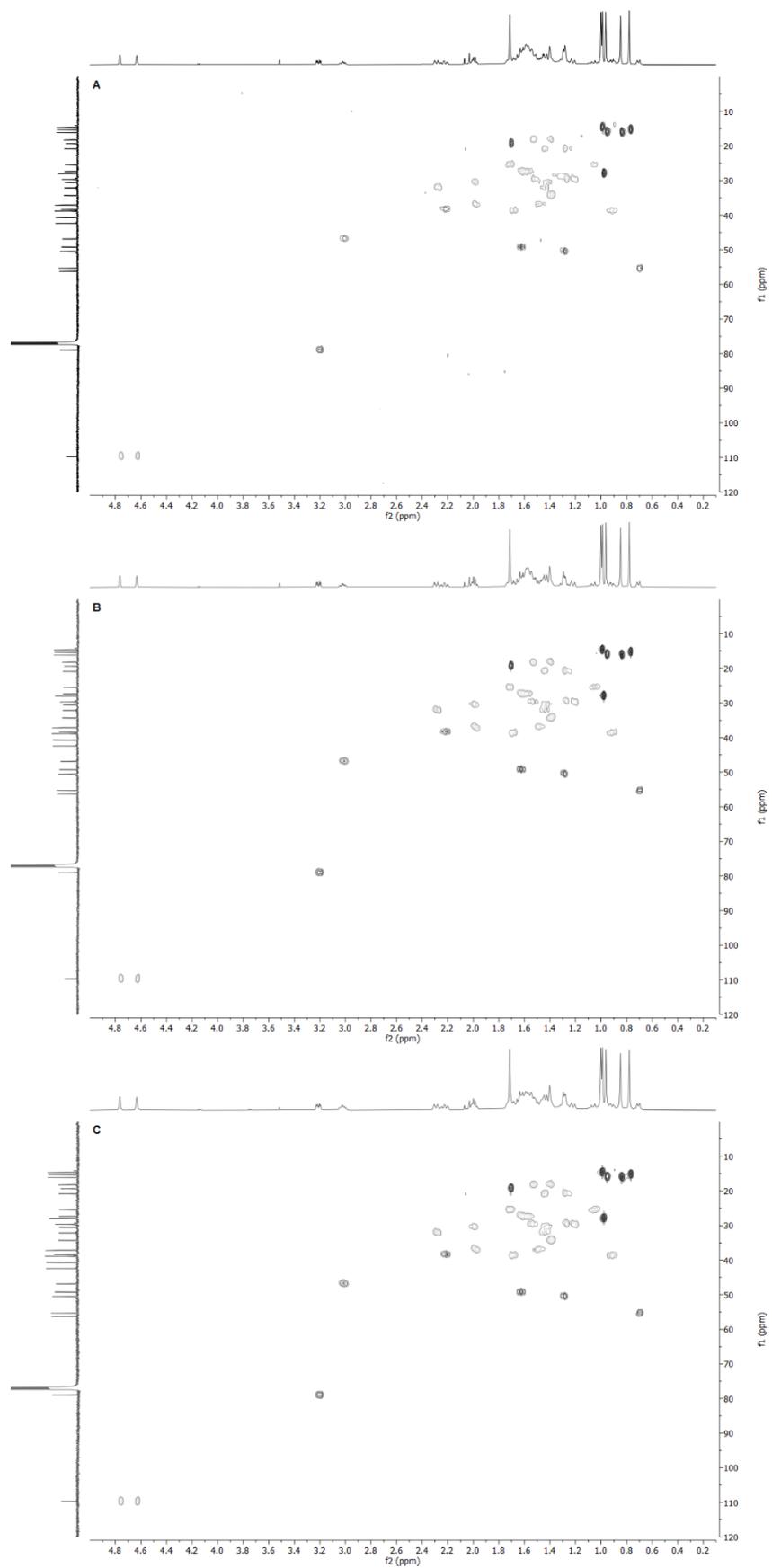


Abbildung 52: ^1H , ^{13}C HSQC Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus *B. monnieri* (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].

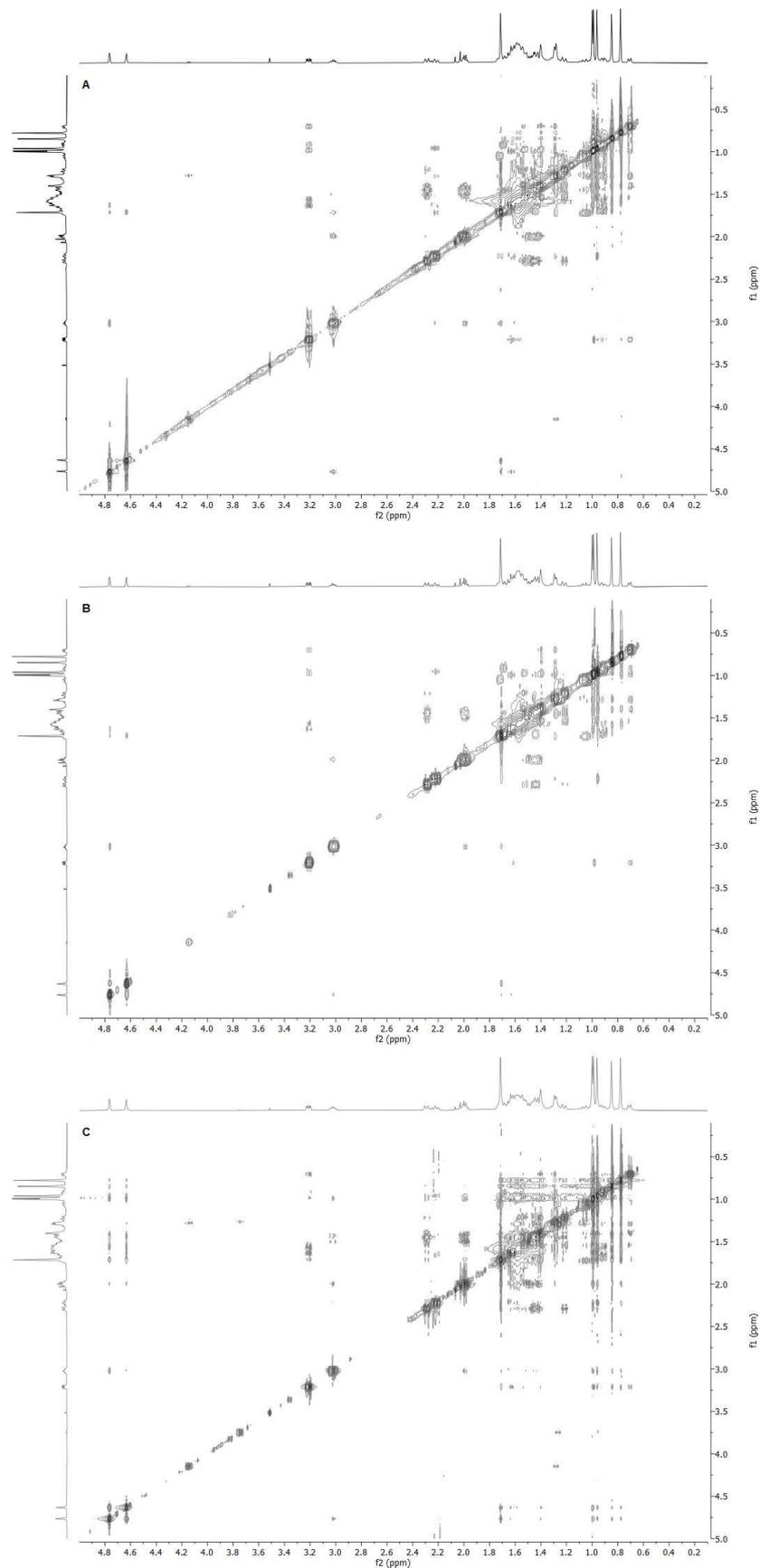


Abbildung 53: ^1H , ^1H NOESY Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus *B. monnieri* (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].

Tabelle 10: Darstellung aller ^1H NMR Daten der Vorhersagen mit den unterschiedlichen Softwarepaketen (ACD/Labs, MestreNova, ChemDraw) im Vergleich mit den Daten der Reinsubstanz (Betulinsäure) gewonnen aus *B. monnieri* (Terra Elements)

C-Atom	ACD/ Labs Bacosin	ACD/ Labs Betulin- säure	Mestre Nova Bacosin (CDCl_3)	Mestre Nova Betulin- säure (CDCl_3)	Chem- Draw Bacosin	Chem Draw Betu- linsäure	Betulin- säure aus <i>B.</i> <i>monnieri</i> (CDCl_3)
	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)
1	1,18 1,72	1,66 1,70	1,12 1,58	0,91 1,66	1,31 1,56	1,31 1,56	0,92 1,67
2	1,77 2,01	1,59 1,84	1,59 1,69	1,59 1,69	1,47 1,72	1,47 1,72	1,57
3	3,64	3,46	3,20	3,20	3,34	3,34	3,21
4	-	-	-	-	-	-	-
5	1,80	0,91	1,45	1,45	0,94	0,94	0,70
6	1,49 1,38	1,41 1,56	1,39 1,59	1,47 1,55	1,38 1,63	1,38 1,63	1,38 1,51
7	1,87 2,06	1,40 1,42	1,49 1,75	1,28 1,57	1,31 1,56	1,31 1,56	1,37 1,38
8	-	-	-	-	-	-	-
9	2,07	1,23	1,45	1,45	0,94	0,94	1,27
10	-	-	-	-	-	-	-
11	1,10 1,54	1,21 1,42	1,16 1,47	1,16 1,47	1,28 1,63	1,38 1,63	1,25 1,42
12	1,09 1,82	1,90 1,97	1,33 1,61	1,34 1,78	1,38 1,63	1,38 1,63	1,05 1,69
13	2,09	2,56	1,46	1,55	1,46	1,04	2,20
14	-	-	-	-	-	-	-
15	1,68 2,68	1,28 1,68	1,99 2,15	1,08 1,44	1,65 1,90	1,31 1,56	1,22 1,52
16	1,82 1,92	2,26 2,63	1,27 1,67	1,37 2,11	1,31 1,56	1,65 1,90	1,42 2,26
17	-	-	-	-	-	-	-
18	1,29	1,69	1,07	1,49	1,07	1,49	1,61
19	2,44	3,54	2,37	3,01	2,09	2,09	3,01
20	-	-	-	-	-	-	-
21	1,40 1,92	1,52 2,24	1,54 1,68	1,54 1,68	1,30 1,55	1,38 1,55	1,41 1,97
22	1,26 1,50	1,59 2,26	1,20 1,38	1,39 1,69	1,25 1,50	1,40 1,65	1,47 1,96
23	0,88	1,06	0,85	0,85	0,89	0,89	0,99
24	1,06	1,23	0,90	0,90	0,89	0,89	0,78
25	0,96	0,85	0,87	0,85	0,84	0,84	0,85
26	1,20	0,91	0,86	0,98	0,89	0,89	0,96
27	-	1,03	-	0,96	12,08	0,89	1,00
28	0,88	-	0,80	-	0,70	12,08	-
29	4,68 4,70	4,56 4,69	4,62	4,67	4,92 5,11	4,92 5,11	4,63 4,76
30	1,64	1,79	1,68	1,68	1,79	1,79	1,71
3-OH	3,52	4,29	2,20	2,20	4,77	4,77	-
COOH	10,57	10,37	10,77	-	12,08	12,08	-

Tabelle 11: Darstellung der ^1H NMR Daten der Reinsubstanz (Betulinsäure) gewonnen aus *B. monnieri* (Terra Elements), der Referenzsubstanz Bacosin (PhytoLab), der Referenzsubstanz Betulinsäure (PhytoLab), des Bacosins gewonnen von Ahmed und Rahman [74], des Bacosins gewonnen von Kishore et al. [169] und der Betulinsäure gewonnen durch Khaliq et al. [182].

C-Atom	Betulinsäure aus <i>B. monnieri</i> (CDCl_3)	Bacosin (CDCl_3)	Betulinsäure (CDCl_3)	Ahmed und Rahman (CDCl_3) [74]	Kishore et al. [169]	Khaliq et al. (CDCl_3) [182]
	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)	δ ^1H (ppm)
1	α : 0,92 β : 1,67	α : 0,92 β : 1,67	α : 0,92 β : 1,67	α : 1,35 β : 1,79	1,36	α : 0,93 β : 1,71
2	1,57	1,57	1,57	α : 1,41 β : 1,44	1,59	α : 1,62 β : 1,57
3	3,21	3,21	3,21	4,27	4,15	3,21
4	-	-	-	-	-	-
5	0,70	0,70	0,70	0,97	1,79	0,71
6	α : 1,51 β : 1,38	α : 1,51 β : 1,38	α : 1,51 β : 1,38	α : 1,47 β : 1,23	1,21	α : 1,53 β : 1,41
7	α : 1,37 β : 1,38	α : 1,37 β : 1,38	α : 1,37 β : 1,38	α : 1,40 β : 1,27	1,36	α : 1,41 β : 1,39
8	-	-	-	-	-	-
9	1,27	1,27	1,27	1,53	1,49	1,29
10	-	-	-	-	-	-
11	α : 1,42 β : 1,25	α : 1,42 β : 1,25	α : 1,42 β : 1,25	α : 2,08 β : 1,59	1,58	α : 1,44 β : 1,29
12	α : 1,05 β : 1,69	α : 1,05 β : 1,69	α : 1,05 β : 1,69	α : 1,09 β : 1,82	1,40	α : 1,06 β : 1,73
13	2,20	2,20	2,20	2,92	2,85	2,22
14	-	-	-	-	-	-
15	α : 1,22 β : 1,52	α : 1,22 β : 1,52	α : 1,22 β : 1,52	α : 2,07 β : 2,28	2,08	α : 1,21 β : 1,56
16	α : 2,26 β : 1,42	α : 2,26 β : 1,42	α : 2,26 β : 1,42	α : 1,83 β : 2,79	1,78	α : 1,42 β : 2,29
17	-	-	-	-	-	-
18	1,61	1,61	1,61	2,13	2,18	1,64
19	3,01	3,02	3,02	2,95	2,68	3,02
20	-	-	-	-	-	-
21	α : 1,97 β : 1,41	α : 1,97 β : 1,41	α : 1,97 β : 1,41	α : 1,56 β : 2,18	1,51	α : 1,41 β : 1,99
22	α : 1,96 β : 1,47	α : 1,96 β : 1,47	α : 1,96 β : 1,47	α : 2,23 β : 1,54	1,54	α : 1,50 β : 1,99
23	0,99	0,99	0,99	0,76	0,96	0,99
24	0,78	0,78	0,78	0,86	0,91	0,78
25	0,85	0,85	0,85	0,93	0,91	0,85
26	0,96	0,96	0,96	0,87	0,84	0,96
27	1,00	1,00	1,00	-	-	1,00
28	-	-	-	0,65	0,76	-
29	α : 4,76 β : 4,63	α : 4,76 β : 4,63	α : 4,76 β : 4,63	α : 4,68 β : 4,55	4,75	α : 4,77 β : 4,64
30	1,71	1,71	1,71	1,64	1,71	1,71
3-OH	-	-	-	1,35	1,93	-

9.2 Abkürzungsverzeichnis

4T1 Zellen	Brustkrebszelllinie aus der Milchdrüse von Albinoratten
AlCl ₃	Aluminiumchlorid
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
AF64A	Ethyl-2 Hydroxyethylaziridinium
AGE	Advanced Glycation Endproduct, glykierte Reaktionsprodukte
APT	attached proton test
ARTN	Artemin
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Bacosid A
BDNF	brain-derived neurotrophic factor, Wachstumsfaktor
BM	<i>Bacopa monnieri</i>
BME	<i>Bacopa monnieri</i> Extrakt
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
BuOH	Butanol
CA	Cornu Ammonis, Regionen im Hippocampus
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDC	cell division cycle, Phosphatase
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHCl ₃	Chloroform
COSY	correlation spectroscopy
CREB	cAMP response binding protein, Transkriptionsfaktor
CUS	chronisch unvorhersehbarer Stress
DCX	Doublecortin
DIA	differenzierungsinduzierende Aktivität
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium, Nährmedium in der Zellkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylamin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
ESI	Elektronensprayionisation
ELSD	Lichtstreuendetektor
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales Kälberserum
GABA	γ-Aminobutyric acid
GC	Gaschromatographie
GFAP	glial fibrillary acidic protein, saures Gliafaserprotein
GluR2	Untereinheit des AMPA Rezeptors

GSK	Glykogensynthase-Kinase
h	Stunden
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HVA	Homovanillinsäure
H ₂ O	Wasser
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	Infrarotspektroskopie
IT TOF	ion trap time of flight
Ki67	Proliferationsmarker
K _x PO ₄	Kaliumphosphat
MCP-1	monocyte chemoattractant protein, Chemokin
MeCN	Acetonitril
MEL-2 Zellen	humane maligne Melanomzellen
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein Zytokin
MM-CI	Methylquecksilberchlorid
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MS	Massenspektrometrie
NaN ₃	Natriumazid
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren
NeuN	neuronal nuclear antigen (Biomarker für Neuronen)
NF- κ B	nuklearer Faktor κ B
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NLA	Normierte Luciferase Aktivität
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOESY	nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy
NPA	3-Nitropropionsäure
NRA	Normierte Renilla Aktivität
OHDA	6-Hydroxydopamin
p38-MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDA	Photodiodenzeile
PDBE	Decabromodiphenylether
PPA	Polyphosphorsäure
RA	Retinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RUNX2	Runt-related transcription factor 2, Transkriptionsfaktor
RP ₁₈	Umkehrphase, Octadecylphase
SNP	Natriumnitroprusside
SPE	Festphasenextraktion
STZ	Streptozotocin
TAA	Thioacetamid
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TFN α	Tumornekrosefaktor α

THP-1	menschliche, monozytische Zelllinie
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
t_R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
VPA	Valproinsäure
ZNS	zentrales Nervensystem

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Neurons mit dem Zellkörper, dem darin enthaltenen Zellkern und den Dendriten, dem Axon mit der Myelinscheide, dem Ranvierschen Schnürring und dem Endknöpfchen nach Hildebrand und Goslow [8].	4
Abbildung 2: Darstellung von Indolactam (links) und Indirubin (rechts) mit ihren strukturellen Ähnlichkeiten (blau), welche möglicherweise den gemeinsamen Pharmakophor darstellen.	9
Abbildung 3: Die Pflanze <i>B. monnieri</i> (eigene Aufnahme).	10
Abbildung 4: Darstellung der beiden strukturisomeren Aglyka der Bacoside der Pflanze <i>B. monnieri</i> Jujubogenin (A) und Pseudojujubogenin (B).	11
Abbildung 5: Darstellung der einzelnen Strukturen des in <i>B. monnieri</i> enthaltenen Saponingemisches Bacosid A: Bacosid A3 (Jujubogenin–Aglykon) (A), Bacopasid II (B) (Pseudojujubogenin–Aglykon), Bacopasid X (C) (Jujubogenin–Aglykon) und Bacopasaponin C (Pseudojujubogenin–Aglykon) (D).	12
Abbildung 6: Darstellung des Flavongrundgerüsts (A) und der beiden im Folgenden untersuchten und in <i>B. monnieri</i> vorkommenden Flavonoide Luteolin mit vier gebundenen Hydroxygruppen an das Flavongrundgerüst (B) und Apigenin mit drei gebundenen Hydroxygruppen an das Flavongrundgerüst (C).	13
Abbildung 7: Darstellung des im Folgenden untersuchten und in <i>B. monnieri</i> vorkommenden Flavonoidglykosides Luteolin-7-glucosid.	13
Abbildung 8: Darstellung des Lupangrundgerüsts (A) und der im Folgenden untersuchten und in <i>B. monnieri</i> beschriebenen Triterpene Betulinsäure (B) und Bacosin (C) (schwarz mit blauen Modifikationen im Vergleich zum Lupangrundgerüst).	14
Abbildung 9: Grundgerüst der aromatischen Aminosäure Tryptophan.	32
Abbildung 10: Darstellung der Grundgerüste von Indirubin (A) und Thioindirubin (B) mit unterschiedlichem Heteroatom an Position 1'. Indirubin enthält Stickstoff als Heteroatom und Thioindirubin enthält Schwefel als Heteroatom.	32
Abbildung 11: Allgemeiner Syntheseweg zur Herstellung von Thioindirubinen nach Riepl und Urmann [127].	33
Abbildung 12: Darstellung der aktivsten Strukturen mit der Ausgangsstruktur Indirubin (A), der Indirubin-3'-monoxim-5-sulfonsäure (B), dem 6,5-Dichloroindirubin-3'-monoxim (C) und dem 6,5-Dichloroindirubin-3'-acetoxim (D).	35
Abbildung 13: Zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen nach Behandlung mit <i>Isatis tinctoria</i> . Aufnahme von Herbert Riepl.	36
Abbildung 14: Darstellung der im Folgenden untersuchten Indolderivate: Indolactam (A), Lyngbyatoxin (B), Teleocidin (C), Olivoretin (D).	36
Abbildung 15: Gehalt an Bacosid A in <i>B. monnieri</i> (mg Bacosid A pro g <i>B. monnieri</i>) bei unterschiedlichen Extraktionsmitteln unter Angabe des Extraktionsmittelvehältnisses (v/v) bei einer rührenden Mazeration.	41

- Abbildung 16: Darstellung der HPLC-ELSD Chromatogramme des Bacosidanteils (Methode 1) des Rohextraktes und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte (Hex = Hexanextrakt, CHCl₃ = Chloroformextrakt, BuOH = Butanolextrakt, H₂O = Wasserextrakt) (10 mg/mL).43
- Abbildung 17: Oben: Darstellung der HPLC-IT TOF Chromatogramme (1mg/mL) der gewonnenen SPE Fraktionen im Bereich von 0-25 Minuten (Positiv-Ionenmodus) (Methode 3). Unten: Darstellung der HPLC-IT TOF Chromatogramme (1 mg/mL) der gewonnenen SPE Fraktionen im Bereich von 0-25 Minuten (Negativ-Ionenmodus) (Methode 3).....45
- Abbildung 18: Oberer Abschnitt: Vergleich der HPLC-ELSD Chromatogramme (Methode 1) des Rohextraktes, des BuOH Extraktes und des SPE Extraktes (60/40) (1 mg/mL). Unterer Abschnitt: Darstellung der Anreicherung des Bacosid A Gehaltes zwischen Rohextrakt, BuOH Extrakt und SPE Extrakt in mg Bacosid A/mg Extrakt.46
- Abbildung 19: Oberer Abschnitt: Vergleich der HPLC-ELSD Chromatogramme (Methode 1) des Rohextraktes, des BuOH Extraktes und des SPE Extraktes (70/30) (1 mg/mL). Unterer Abschnitt: Darstellung der Anreicherung des Luteolin Gehaltes zwischen Rohextrakt, BuOH Extrakt und SPE Extrakt in mg Luteolin/mg Extrakt.47
- Abbildung 20: Darstellung der beiden Strukturisomere Betulinsäure (A) und Bacosin (B) mit der Summenformel C₃₀H₄₈O₃. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte nach IUPAC [168].....49
- Abbildung 21: Darstellung der HPLC-ELSD Chromatogramme (Methode 2) des Rohextraktes aus *B. monnieri* und der beiden Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure.52
- Abbildung 22: Darstellung der beiden Strukturen Oleanolsäure (A) und Ursolsäure (B) mit Nummerierung der Kohlenstoffatome nach IUPAC.53
- Abbildung 23: Darstellung der Untersuchungen verschiedener Extrakte und Reinsubstanzen mittels HPLC-IT TOF (Methode 3). Von oben nach unten: Basispeakchromatogramm des Chloroformextraktes (Terra Elements), extrahierte Negativ-Ionenmodus Massenspur [M-H]⁻ = 455,35 der Chloroformextrakte verschiedener Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmitteln verschiedenen Ursprungs und eines Soxhlet Extraktes aus Pflanzenmaterial von Terra Elements, der Reinsubstanz extrahiert aus *B. monnieri* (Terra Elements) (Betulinsäure) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (Phytolab) (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (Phytolab) (C).54
- Abbildung 24: Darstellung der gesamten GC-MS Chromatogramme der Referenzsubstanzen Bacosin (dunkelgrau) und Betulinsäure (grau) von 0-45 Minuten (A) und Ausschnitt des Hauptpeaks in einem Bereich von 30,2-30,4 Minuten (B).55
- Abbildung 25: Darstellung des Fragmentierungsmusters der Betulinsäure angelehnt an Ayatollahi et al. [181].....56
- Abbildung 26: ¹H NMR Spektren der aus *B. monnieri* extrahierten Reinsubstanz (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].59

- Abbildung 27: ^{13}C NMR Spektren der aus *B. monnieri* extrahierten Reinsubstanz (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].59
- Abbildung 28: Verdeutlichung der Strukturen mit unterschiedlichen Sessel-Sessel-Sessel-Sessel-Boot Konformationen und dem 5-H-Atom (blau), (A): mögliche Struktur gemessen durch Ahmed und Rahman und (B): Betulinsäure.....62
- Abbildung 29: Darstellung der gemessenen $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HMBC; $^1\text{H},^1\text{H}$ COSY und $^1\text{H},^1\text{H}$ NOESY Kopplungen für die Referenzsubstanzen Bacosin und Betulinsäure und für die Betulinsäure extrahiert aus *B. monnieri* [168].63
- Abbildung 30: Differenzierungsinduzierende Aktivität des Rohextraktes (RE) und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$) in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$67
- Abbildung 31: Normierte Renilla Aktivität des Rohextraktes (RE) und der durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gewonnenen Extrakte aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$) in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$. Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.....68
- Abbildung 32: Differenzierungsinduzierende Aktivität der durch Festphasenextraktion gewonnenen Extrakte des Butanolextrakts aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$) in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$69
- Abbildung 33: Normierte Renilla Aktivität der durch Festphasenextraktion gewonnenen Extrakte des Butanolextrakts aus *B. monnieri* unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$) in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$. Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.70
- Abbildung 34: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität des Festphasenextraktes (70/30) ($1 \mu\text{g/mL}$) und des Luteolins (L) in der im Festphasenextrakt (70/30) enthaltenen Konzentration ($0,035 \mu\text{g/mL}$) (links) und der normierten Renilla Aktivität (rechts) unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.71
- Abbildung 35: Oberer Abschnitt: Darstellung der Betulinsäure. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (links) und der normierten Renilla Aktivität (rechts) von Betulinsäure in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$ unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.....74
- Abbildung 36: Oberer Abschnitt: Darstellung der in Bacosid A enthaltenen einzelnen Substanzen als Strukturen: Bacosid A3 (A), Bacopasid II (B), Bacopasid X (C) und Bacopasaponin C (D). Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität (links) und der normierten Renilla Aktivität (rechts) von Bacosid A in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$ unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.77
- Abbildung 37: Oberer Abschnitt: Darstellung der Strukturen von Apigenin (A), Luteolin (L) und Luteolin-7-glucosid (L7G) nach dem nachfolgend verwendeten Farbschema. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Flavonoide in Konzentrationen von $1 \mu\text{g/mL}$ und $10 \mu\text{g/mL}$ unter Einbeziehung des Vehikels ($y = 1$).79

Abbildung 38: Darstellung der normierten Renilla Aktivität der Flavonoide Apigenin (A), Luteolin (L) und Luteolin-7-glucosid (L7G) in Konzentrationen von 1 µg/mL und 10 µg/mL unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.	80
Abbildung 39: Darstellung der Absorptionsspektren von 5'-Thioindirubinessigsäure (A), 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methylthioindirubin (C), 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) im Bereich von 370-680 nm.	81
Abbildung 40: Oberer Abschnitt: Darstellung der Strukturen von 5'-Thioindirubinessigsäure (A), 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methylthioindirubin (C), 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) nach dem nachfolgend verwendeten Farbschema. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Thioindirubine in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1).....	83
Abbildung 41: Darstellung der normierten Renilla Aktivität der Thioindirubine 5'-Thioindirubinessigsäure (A), 5'-Chlor-5-Methylthioindirubin (B), 5'-Methylthioindirubin (C), 5'-Methyl-5-Fluorthioindirubin (D), 5'-Methyl-5-Chlorthioindirubin (E), 5'-Methyl-5-Bromthioindirubin (F) und 5'-Methyl-5-Methoxythioindirubin (G) in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.	84
Abbildung 42: Darstellung der Strukturen von Kenpaullon (A), SB-216763 (B) und Indirubin-3'-monoxim (C).	86
Abbildung 43: Darstellung der Strukturen von Indirubin (A), Thioindirubin (B) und Hesperadin (C) mit ihren Strukturähnlichkeiten in grün.....	87
Abbildung 44: Oberer Abschnitt: Darstellung der Strukturen von Indolactam (I), Lyngbyatoxin (L), Teleocidin (T), Olivoretin (O) nach dem nachfolgend verwendeten Farbschema. Unterer Abschnitt: Darstellung der differenzierungsinduzierenden Aktivität der Indolderivate in Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1).....	88
Abbildung 45: Darstellung der normierten Renilla Aktivität der Indolderivate Indolactam (I), Lyngbyatoxin (L), Teleocidin (T), Olivoretin (O) Konzentrationen von 1 µM und 10 µM unter Einbeziehung des Vehikels (y = 1). Signifikanzen im Vergleich zur Positivkontrolle RA/VPA.	89
Abbildung 46: Indolactam (A) und Kenpaullon (B) mit ihren Strukturähnlichkeiten in grün.	90
Abbildung 47: Darstellung von Thioindirubin (A) und 5'-Methylthioindirubin (B).	94
Abbildung 48: Darstellung aller differenzierungsinduzierenden Indolalkaloide, welche Strukturähnlichkeiten mit 5'-Methylthioindirubin (A) aufweisen: Kenpaullon (B), SB-216763 (C) und 6'-Bromindirubin-3'-monoxim (D).....	94
Abbildung 49: Allgemeiner Syntheseweg zur Herstellung von Thioindirubinen nach Riepl und Urmann [127] unter Beschriftung der wichtigsten Reaktionsschritte.	103

Abbildung 50: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].	121
Abbildung 51: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].	122
Abbildung 52: $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].	123
Abbildung 53: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ NOESY Spektren der Reinsubstanz extrahiert aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements) (A), der Referenzsubstanz Bacosin (B) und der Referenzsubstanz Betulinsäure (C) [168].	124

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der hergestellten Thioindirubinderivate.	33
Tabelle 2: Darstellung der IC ₅₀ Werte (μM) für die Inhibition verschiedener Kinasen (GSK-3 (α/β), CDK1 und CDK5) von Indirubin und Indirubinderivaten (in grün: kleinster IC ₅₀) [32, 33, 129, 130].	34
Tabelle 3: Darstellung der zur Extraktion von <i>B. monnieri</i> verwendeten Extraktionsmethoden, Extraktionsmittel und des Extraktionsmittelverhältnisses unter Angabe der Literaturstellen.	40
Tabelle 4: Darstellung aller ¹³ C NMR Daten der Vorhersagen mit den unterschiedlichen Softwarepaketen (ACD/Labs, MestreNova, ChemDraw) im Vergleich mit den Daten der Reinsubstanz (Betulinsäure) gewonnen aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements) (starke Unterschiede: fettgedruckt und farbig).	58
Tabelle 5: Darstellung der ¹³ C NMR Daten der Vorhersagen mit den unterschiedlichen Softwarepaketen (ACD/Labs, MestreNova, ChemDraw), des Bacosins gewonnen von Ahmed und Rahman [74], des Bacosins gewonnen von Kishore et al. [169] und der Betulinsäure gewonnen durch Khaliq et al. [182] (starke Unterschiede: fettgedruckt und farbig).	61
Tabelle 6: Darstellung der Inhaltsstoffe aller untersuchten Pflanzenmaterialien und Nahrungsergänzungsmittel.....	97
Tabelle 7: HPLC-ELSD-Methode 1 zur Bestimmung des Luteolingehaltes und des Bacosidgehaltes.	99
Tabelle 8: HPLC-ELSD-Methode 2 zur Untersuchung von Bacosin und Betulinsäure.	99
Tabelle 9: HPLC-IT TOF-Methode 3 zur Analyse der SPE Extrakte und der Betulinsäure in Extrakten und Nahrungsergänzungsmitteln.	100
Tabelle 10: Darstellung aller ¹ H NMR Daten der Vorhersagen mit den unterschiedlichen Softwarepaketen (ACD/Labs, MestreNova, ChemDraw) im Vergleich mit den Daten der Reinsubstanz (Betulinsäure) gewonnen aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements).....	125
Tabelle 11: Darstellung der ¹ H NMR Daten der Reinsubstanz (Betulinsäure) gewonnen aus <i>B. monnieri</i> (Terra Elements), der Referenzsubstanz Bacosin (PhytoLab), der Referenzsubstanz Betulinsäure (PhytoLab), des Bacosins gewonnen von Ahmed und Rahman [74], des Bacosins gewonnen von Kishore et al. [169] und der Betulinsäure gewonnen durch Khaliq et al. [182]......	126

Veröffentlichungen und Stipendien

Publikation

Ritter S., Urmann C., Herzog R., Glaser J., Bieringer S., Geisberger T., Eisenreich W., Riepl H.
Where Is Bacosine in Commercially Available *Bacopa monnieri*?
Planta Medica, Vol 68(8), S. 565-570 DOI 10.1055/a-1137-4289

Poster

Ritter S., Urmann C. and Riepl H.
Extraction, antioxidative capacity and cytotoxicity of bacosides.
19th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology, Dresden,
Juni 12-14, 2019.

Ritter S., Urmann C. and Riepl H.
Study of neurodifferentiation potential of different extracts of *Bacopa monnieri*.
67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Innsbruck, September 01-05, 2019. Planta Medica, Vol 85, S. 1549,
DOI 10.1055/s-0039-3400091

Stipendien

Young Investigator Fellowship for the 19. International Congress of the International Society für Ethnopharmacology (Dresden, 2019)

Teilstipendium der GDCh für Kongressreisen (Innsbruck, 2019)