

Biochemisch-pharmakologische Untersuchung pflanzlicher Arzneistoffe

II. Hemmung der Acetylcholinesterase durch Monoterpenderivate *in vitro*

Molecular Pharmacological Investigation of Medicinal Plant Substances

II. Inhibition of Acetylcholinesterase by Monoterpene Derivatives *in vitro*

L. Gracza

Wissenschaftliche Abteilung der Chemisch-Pharmazeutischen Fabrik Göppingen, Carl Müller, Apotheke, GmbH u. Co. KG, D-7320 Göppingen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **40 c**, 151–153 (1985); received September 10/October 10, 1984

Monoterpene Derivates, Acetylcholinesterase Inhibiting Activity, Distony of Digestive Tract

Monoterpene derivatives with spasmolytic activity inhibited acetylcholinesterase (ACHE, EC 3.1.1.7) in a dose dependent manner *in vitro*. The median inhibitory concentrations ranges between 10^{-4} M and 10^{-2} M. A significance of our finding may be the possible explanation of effects of monoterpene derivatives seen in distony of digestive tract.

Einleitung

Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise pflanzlicher Arzneistoffe ist es notwendig, ihre Wirkung auf molekularer Ebene zu untersuchen. Man bedient sich dabei der sog. biochemisch-pharmakologischen (molekularpharmakologischen) Methoden [1], wohl bewußt, daß durch den Einsatz solcher Modelle (im Sinne von [2]) Resultate erzielt werden, die unter *in-vivo*-Bedingungen überprüft werden müssen [3]. Durch den Einsatz der Modelle ist es jedoch möglich, im primären pharmakologischen Screening wertvolle Informationen zur Wirkung der Phytopharmaka zu gewinnen [4]. In solchen Fällen, wo die pharmakologische Wirkung auf der Beeinflussung von Enzymen bzw. Enzymsystemen beruht, kann die Prüfung an Enzymen zum Wirkungsnachweis bzw. zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus herangezogen werden, wobei die Untersuchung an Enzymen *in vitro*, über Homogenat – Zellkultur – Gewebeschnitt – perfundiertes Organ – Ganztier zu stark angenäherten Bedingungen *in vivo* führen muß [5]. In der vorhergehenden Arbeit [6] haben wir über die Wirkung von Rosmarinsäure auf die Lipidperoxidation berichtet. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, den Einfluß von pflanzlichen Monoterpenderivaten auf die Aktivität der Acetylcholinesterase (ACHE) zu untersuchen, um Angaben zum möglichen Wirkungsmechanismus dieser Substanz im Magen-Darm-Trakt zu gewinnen.

Material und Methoden

Die geprüften Reinsubstanzen wurden von der Fa. Fluka, Acetylcholinesterase aus Zitteraal (ACHE, EC 3.1.1.7) von der Firma Sigma bezogen. Die ätherischen Öle wurden aus authentischen Drogen nach der Methode des Europäischen Arzneibuches [7] frisch destilliert und nach den entsprechenden Monographien des Deutschen Arzneibuches kontrolliert. Die Prüfsubstanzen wurden in einer Phosphatpufferlösung (pH 7,0) mit 1 mg/ml Polyoxyethylensorbitan-Monooleat gelöst. Das Enzym wird von dem Solubilisator in der verwendeten Konzentration nicht beeinflußt. Die Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität erfolgte mit der Methode [8]. Die Prüfung der Grenzflächenspannung (σ) wurde mit der stalagmometrischen Methode [9] durchgeführt. Die Substanzen (S) wurden dabei in 45-prozentigem (m/m) Ethylalkohol (LM) zu 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0% (m/V) gelöst. 1,0 ml der Lösungen wurde u 50,0 ml künstlichem, im Thermostat temperiertem Darmsaft (DS) gegeben (SL). Die Prüfung erfolgte bei 20 °C. Parallel wurde die Grenzflächenspannung des künstlichen Darmsaftes mit dem Lösungsmittel gemessen, und letzteres bei der Auswertung der Meßergebnisse in Korrektur genommen ($\Delta\sigma = \sigma_{DS+LM} - \sigma_{SL}$).

Ergebnisse

Die untersuchten Monoterpenderivate weisen eine dosisabhängige Hemmwirkung auf ACHE auf

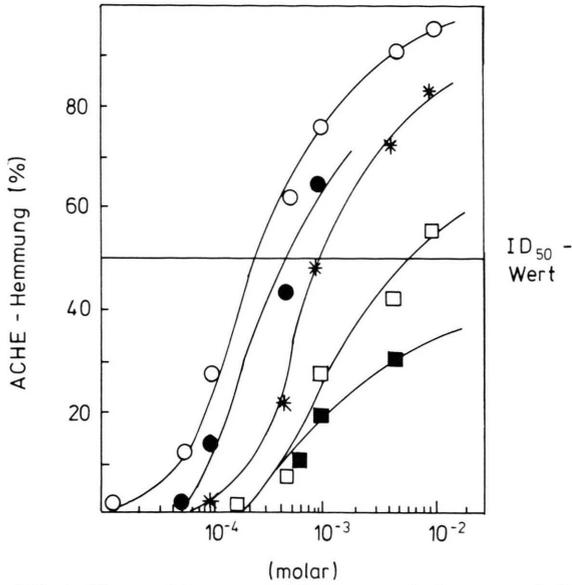


Abb. 1. Hemmwirkung von Monoterpenderivaten auf die ACHE-Aktivität (○—○: 1,8-Cineol, ●—●: Carvacrol, *—*: (+)-Carvon, □—□: Fenchon, ■—■: Thymol).

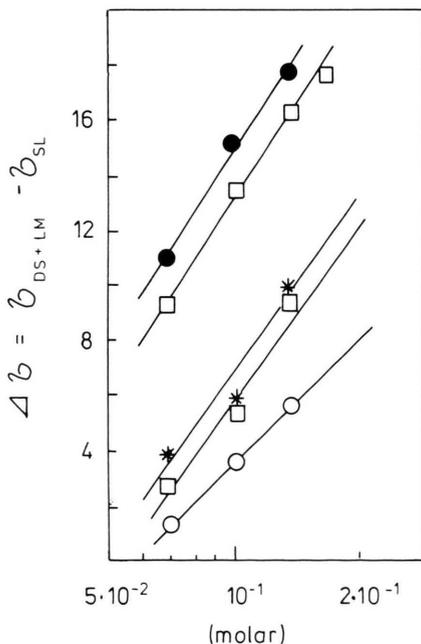


Abb. 2. Grenzflächenaktivität von Monoterpenderivaten (Zeichenerklärung in Abb. 1) SL = Substanzlösung, LM = Lösungsmittel, DS = künstlicher Darmsaft.

(Abb. 1). Die Werte in der Abb. 1 sind Durchschnittswerte aus drei Parallelbestimmungen.

Die Reproduzierbarkeit der Werte ist ausreichend. Die Standardabweichung (s) liegt z. B. bei (+)-Carvon zwischen 1,89 und 7,55. Die ID_{50} -Werte (molare Konzentrationen, bei denen eine 50-prozentige Hemmwirkung zu beobachten ist), liegen in den meisten Fällen im Konzentrationsbereich von 10^{-4} und 10^{-2} molar.

Die Hemmwirkung ist unabhängig von der Grenzflächenaktivität der Substanzen. Sie setzen nämlich erst in höherer Konzentration die Grenzflächenaktivität der Lösungen herab. Es besteht darüber hinaus kein Zusammenhang zwischen Enzymhemmung und Grenzflächenaktivität (Abb. 1 und 2).

Diskussion

Es wurde schon versucht, Zusammenhänge zwischen der konvulsiven und vasodilatatorischen Wirkung von *Oleum Majoranae* bzw. dem Auslösen epileptiformer Krämpfe durch *Oleum Hyssopi*, *Oleum Salviae* und *Oleum Rosmarini* einerseits und ihrer Hemmwirkung auf ACHE andererseits herzustellen [10]. Bei der Prüfung von Pestizidrückständen in Extrakten aus Gemüsen wurde weiterhin beobachtet, daß Auszüge, die ätherisches Öl oder Senföl enthalten (Extr. *Apii graveolentis* und Extr. *Brassicae oleraceae*), das ACHE zu hemmen vermögen [11]. Die von uns untersuchten Terpendervative sind Bestandteile von Magen-Darm-Präparaten.

Es ist allgemein bekannt, daß die glatte Muskulatur des Magen-Darm-Kanals auf den Überträgerstoff der Nervenregung Acetylcholin (ACH) mit Tonuszunahme und schließlich spastischer Kontraktion reagiert. Es ist weiterhin bekannt, daß die Biosynthese und Biotransformation des ACH durch Cholinacetylase bzw. Acetylcholinesterase enzymatisch reguliert wird.

Unter physiologischen Bedingungen ist die Dauer der Erregung durch die Enzyme geregelt. Der gestörte Regulationsmechanismus manifestiert sich als Dystonie (Atonie oder Spasmus). Die Antidystonika entfalten ihre Wirkung bei Atonie durch Motilitätssteigerung (Anregung der Peristaltik [12], [13] und zitierte Literatur), bei schmerzhaftem Zusammenziehen der betreffenden Hohlgänge durch Spasmyolyse ([14], [15] und zitierte Literatur). Diese ambivalente (antiatonische und spasmyolytische) Wirkung

Tab. I. Zusammenhang zwischen antidystonischer Wirkung und ACHE-Hemmung (^a c = 1 mg/ml; ^b c = 5 × 10⁻³ molar).

Antidystonische Wirkung [19]		
Fructus Carvi > Fructus Foeniculi > Fructus Anisi		
ACHE-Hemmung		
Oleum Carvi ^a	> Oleum Foeniculi ^a	> Oleum Anisi ^a
72%	39%	0%
(+)-Carvon ^b	> Fenchon: Anethol ^b	> Anethol ^b
	(40:60)	
76%	16%	0%

könnte nun mit der beobachteten ACHE-hemmenden („indirekten“ cholinergischen) Wirkung einerseits und mit der bekannten spasmolytischen Wirkung der Substanzen andererseits als regulative Wirkung erklärt werden. Das gleiche Phänomen, Tonussteigerung und Spasmyse, wurde schon bei folgenden Pflanzenstoffen beobachtet: Tct. und Extr. Teucry scorodoniae, Extr. Echinaceae und Populi, Oleum Menthae und Foeniculi, Chelidonin und Sanguinarin bzw. bei einer Extrakt-Mischung aus *Rubia tinctorum*, *Ammi visnaga*, *Solidago virgaurea*, *Taraxacum officinale* und Aescin.

Die Wirkungsweise erinnert uns an die paradoxe Wirkung der Valeriana-Präparate, die gleichzeitig beruhigend (sedativ) bzw. mild aktivierend (toniko-exzitativ) wirken und als Äquilantien bezeichnet

werden [16]. Solche paradoxen Wirkungen sind übrigens bei den Phytotherapeutika nicht selten. Es sei hier nur an die hyperalgetische bzw. analgetische Wirkung des Capsaicins [17] oder an die tonisierende bzw. tonolytische Wirkung des Theophyllins [18] erinnert.

Grenzflächenaktive Substanzen zeigen bekanntlich oft Hemmwirkungen auf verschiedenen Enzymen. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Hemmwirkung der Monoterpenderivate auf die ACHE nicht auf ihrer Grenzflächenaktivität beruht.

Welche Bedeutung der beobachteten ACHE-hemmenden Wirkung zukommen könnte, zeigt die Tatsache, daß die Wirksamkeit der drei in der Phytotherapie meist angesetzten Antidystonika [19] mit ihrer Hemmwirkung auf ACHE parallel geht (Tab.).

Eine *in vivo*-Überprüfung der Ergebnisse mit der Darmgeräuschanalyse ist in Vorbereitung.

Der Befund unterstützt die Meinung von Prof. Thaler, der festgestellt hat [13], daß bei Darmstörungen pflanzliche Präparate, die über eine Anregung der Peristaltik zu wirken scheinen, mit Vorteil angewendet werden können.

Danksagung

Für die gewissenhafte technische Mitarbeit danke ich Herrn P. Ruff auch an dieser Stelle.

- [1] E. Mutschler, Arzneimittelwirkungen, S. 4 – Wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttgart 1981.
- [2] L. v. Bertalanffy, *Studium generale* **18**, 290 (1965).
- [3] R. Eberl u. W. Siegmeth, Antiinflammatorisch wirksame Substanzen, in *Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie* (H. P. Kiemmerle, Hrsg.), S. 827, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1976.
- [4] S. S. Chatterje u. V. Stefanovich, *Arzneim.-Forsch. (Drug. Res.)* **26** (I), 499 (1976).
- [5] W. Gruber, *Arzneim.-Forsch.* **20**, 1825 (1970).
- [6] L. Gracza, H. Koch u. E. Löffler, *Arch. Pharm. zur Veröffentlichung, im Druck*.
- [7] *Europäisches Arzneibuch*, Band **III**, S. 80.
- [8] S. Hestrin, *J. Biol. Chem.* **180**, 249 (1949).
- [9] L. Gracza, *Planta Med.* **42**, 155 (1981).
- [10] F. Caujolle, D. Vincent u. C. Franck, *C. R. de la Soc. de Biol.* **138**, 556 (1944).
- [11] H. Ackermann, *Nahrung* **12**, 357 (1968).
- [12] E. Steinegger u. R. Hänsel, *Lehrbuch der Pharmakognosie*, S. 394, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York 1968.
- [13] H. Thaler, *Pharmakotherapie des Verdauungsapparates*, in *Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie* (H.-P. Kiemmerle, Hrsg.), S. 869, Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1976.
- [14] H. Wagner u. L. Sprinkmeyer, *Deutsche Apoth.-Ztg.* **113**, 1159 (1973).
- [15] B. K. Evans, K. C. James u. D. K. Luscombe, *J. Pharm. Sci.* **67**, 277 (1978).
- [16] G. Rücker, *Pharm. uns. Zeit* **8**, 78 (1979).
- [17] *Lancet* **1983** (I), 1198.
- [18] H. Magnussen u. M. Scheidt-Mackes: *Deutsche Med. Wschr.* **103**, 309 (1983).
- [19] J. H. Kaiser u. R. Hohlfeldt, *Hippokrates* **29**, 441 (1958).