Aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Untersuchungen zur Pharmakokinetik von NADH in vivo und in vitro

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kathrin Kappes
Tierärztin aus München

Berlin 2005
Journal-Nr.: 2952

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Fink
Zweiter Gutachter: PD. Dr. C. Rundfeldt
Dritter Gutachter: Prof. Dr. H. Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
NADH; pharmacokinetics

Tag der Promotion: 28.10.2005

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN 3-86664-054-4 / 978-3-86664-054-2
Dissertation, Freie Universität Berlin, 2005
D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

This document is protected by copyright.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of Mensch & Buch Verlag.

© Mensch & Buch Verlag
Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
info@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Literatur 2

2.1. Biologische Funktion und chemisch-physikalische Eigenschaften von NADH 2
2.1.1. NADH und seine Rolle im Zellmetabolismus als Elektronencarrier 2
2.1.2. Strukturanalyse von NADH 6
2.1.3. Spektroskopische Eigenschaften von NAD^+/NADH 7
2.1.4. Vorkommen von NADH 10

2.2. Mögliche therapeutische und diagnostische Einsatzgebiete von NADH 12
2.2.1. Mitochondriale Erkrankungen 12
2.2.2. Physiologischer Alterungsprozess 13
2.2.3. Morbus Parkinson 14
2.2.4. Morbus Alzheimer 19
2.2.5. Wirkung von NADH auf die Apoptoserate 21
2.2.6. Mögliche antidepressive Wirkung von NADH 23
2.2.7. Antihypertensiver Effekt von NADH 24
2.2.8. Experimenteller Einsatz der NADH Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der Tumorgrösse 25
2.2.9. Experimenteller Einsatz der NADH Fluoreszenzmessung zur Erkennung ischämischer Läsionen 25

2.3. Nachweismethoden für NADH 28
2.3.1. Enzymatische Verfahren zum Nachweis von NADH 29
2.3.1.1. Spektrophotometrische Bestimmung 29
2.3.1.2. Fluorimetrische Bestimmung 29
2.3.1.3. Enzymatic Cycling 30
2.3.2. Bestimmung mittels Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC) 31
2.3.3. Messung der NADH Fluoreszenz mittels Laser-induzierte Fluoreszenz-spektroskopie (LIF) 31
2.3.3.1. Aufbau eines Laserfluoroskopes 32

2.4. Modelle zur Untersuchung der intestinalen Resorption 38

3. Eigene Untersuchungen 41

3.1. Material und Methoden 41
3.1.1. Tiermaterial 41
3.1.2. Verwendete Substanzen 42
3.1.3. Versuche zur intestinalen Resorption von NADH *in vitro* 42
3.1.3.1. Vorbereitung der verwendeten Substanzen 42
3.1.3.2. Versuchsplan 43
3.1.3.3. Vorbereitung der Apparatur 44
3.1.3.4. Vorbereitung der Gewebeprobe 44
3.1.3.5. Versuchsdurchführung 45
3.1.3.6. Analytik: Messung der Konzentration von Diazepam, g-Strophantin und NADH mittels HPLC 46
3.1.3.7. Versuchsauswertung und Statistik 48

3.1.4. Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte nach sublingualer Verabreichung verschiedener NADH und NAD $^+$Konzentrationen 49
3.1.4.1. Vorbereitung der verwendeten Substanzen 49
3.1.4.2. Messapparatur 49
3.1.4.3. Vorbereitung und Wartung des Gerätes 51
3.1.4.4. Versuchsvorbereitung 51
3.1.4.5. Versuchsdurchführung 53
3.1.4.6. Versuchsauswertung und Statistik 56

3.2. Versuchsergebnisse

3.2.1. Intestinale Resorptionsquoten von Diazepam, g-Strophantin und NADH in drei verschiedenen Konzentrationen *in vitro* 58
3.2.2. Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der Ratte *in vivo* mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie 59
3.2.2.1 Messung der kortikalen NADH Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen 59
3.2.2.2. Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer letalen Dosis Chloralhydrat 60
3.2.2.3. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NADH in der Dosis von 10mg/kg 61
3.2.2.4. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NADH in der Dosis von 50mg/kg 62
3.2.2.5. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NADH in der Dosis von 100mg/kg 63
3.2.2.6. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NAD^+ in der Dosis von 10mg/kg 64
3.2.2.7. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NAD^+ in der Dosis von 50mg/kg 65
3.2.2.8. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NAD^+ in der Dosis von 100mg/kg 66
3.2.2.9. Zusammenfassung der *in vivo* Versuchsergebnisse 67
3.2.2.10. Darstellung der NADH Fluoreszenzzunahme als Fläche unter der Kurve nach sublingualer NADH Verabreichung 68
3.2.2.11. Darstellung der NADH Fluoreszenzzunahme als Fläche unter der Kurve nach sublingualer NAD $^+$Verabreichung 69

4. Diskussion 70

5. Zusammenfassung 80

6. Summary 82

7. Literaturverzeichnis 84

Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

Acetyl-Co A = Acetyl-Coenzym A

ATP = Adenosintriphosphat

AUC = Area under the curve; Fläche unter der Kurve

DNS = Desoxyribonukleinsäure

ETK = Elektronentransportkette

FAD = Flavin-Adenin-Dinucleotid

GTP = Guanosintriphosphat

HPLC = Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

LIF = Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie

NaCl = Natrium Chlorid

NADH = Nicotinamid-adenindinukleotid

NADPH = Nictoinamid-adenindinukleotid-phosphat

ZNS = zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) spielt als Elektronen-Transportmolekül eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel aller Lebewesen. Bruttoenergie wird in Form von Nahrung aufgenommen, die erst über zahlreiche Zwischenschritte in die physiologisch nutzbare Energiequelle Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt werden muss, bevor sie ihre eigentliche Funktion erfüllen kann. Die Energie wird schrittweise in Form hochenergetischer Elektronen freigesetzt. Diese werden von NADH eingefangen, welches dabei seinen Redoxzustand ändert ($NAD^+ \rightarrow NADH$). Als Transportmolekül sorgt es dafür, dass die besagten Elektronen in Richtung ATP synthetisierende Prozesse geleitet werden. Außerdem fungiert NADH als Cosubstrat zahlreicher Enzyme.

Das Verhältnis $NADH/NAD^+$ ist vom Redoxstatus der Zelle abhängig; Veränderungen der NADH Konzentration spiegeln Veränderungen des intrazellulären Redoxzustandes wider. NADH kann deshalb als Markermolekül für den Energiezustand der Zelle herangezogen werden. Die Bestimmung von NADH wird durch seine Eigenschaft als endogenes Fluorophor erleichtert. Bei Bestrahlung mit Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge emittiert NADH ein blaues Fluoreszenzsignal. Steht, wie im Falle des Lasers, eine monochromatische Lichtquelle zur Verfügung, so ist es möglich, selbst kleinste Mengen einer autofluoreszierenden Substanz nachzuweisen.

Die indirekte Beteiligung von NADH an mehr oder weniger allen energiekonsumierenden Prozessen erklärt auch die Fülle und Vielgestaltigkeit der Forschungsansätze, die im Zusammenhang mit diesem Molekül zu finden sind. Die Einsatzmöglichkeiten reichen über Tumordiagnostik, experimentelles Therapeutikum bei Alzheimer und Parkinson bis zur Beobachtung eines möglicherweise antidepressiven Effektes. Extern (oral und intravenös) verabreichtes NADH wird vor allem im Rahmen der Parkinsontherapie als vielversprechendes Mittel angepriesen (Birkmayer et al., 1989 und 1993; Kuhn et al., 1996) und in den USA bereits als solches vermarktet. Es existiert jedoch wenig Information darüber, ob NADH überhaupt in therapeutisch wirksamen Mengen vom Organismus aufgenommen wird bzw. letztendlich auch das zentrale Nervensystem erreicht.

Im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten wir deshalb an einem *in vitro* Modell, ob NADH enteral resorbierbar ist.

Im zweiten Teil der Arbeit gingen wir der Frage nach, ob NADH nach sublingualer Verabreichung das ZNS erreicht und dort nachgewiesen werden kann. Zum Nachweis der NADH Fluoreszenz bedienten wir uns der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie. Die Versuche wurden *in vitro* am Rattendarm und *in vivo* im Kortex der narkotisierten Ratte durchgeführt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erweiterung bestehender Kenntnisse über die Pharmakokinetik von NADH.

2. Literatur

2.1. Biologische Funktion und chemisch-physikalische Eigenschaften von NADH

2.1.1. NADH und seine Rolle im Zellmetabolismus als Elektronencarrier

Die vom Körper in Form von Nahrung aufgenommene „Bruttoenergie“ muss zunächst über zahlreiche katabole Zwischenschritte abgebaut und umgewandelt werden, um als physiologisch nutzbare Energiequelle ATP ihren eigentlichen Zweck zu erfüllen. NAD^+ spielt als Überträgersubstanz von hochenergetischen Elektronen eine zentrale Rolle in dieser Reaktionsfolge.

Vereinfacht gesehen kann man den Katabolismus in drei Abschnitte gliedern (Alberts et al., 2004):

1. Die im Extrazellulärraum stattfindende, von Enzymen angetriebene „Verdauung“. Hier findet die Aufspaltung makromolekulärer Nahrungsbestandteile in ihre Untereinheiten statt: Kohlenhydrate werden zu Glukose, Proteine zu Aminosäuren und Fette zu Fettsäuren und Glyzerol abgebaut.
2. Umwandlung der genannten Untereinheiten in Pyruvat und Azetyl-Coenzym A (Azetyl-CoA). Im Zytosol findet die Konversion der meisten aus Kohlenhydraten stammenden Kohlenstoff- und Wasserstoffatome zu Pyruvat statt, letzteres diffundiert durch die Mitochondrienmembran und wird dort zur Azetyl–Gruppe von Azetyl-CoA weiterverarbeitet. Fettsäuren werden direkt in Azetyl-CoA umgewandelt. Bei diesem Schritt entstehen bereits geringe Mengen ATP und NADH.
3. Vollständige Oxidation von Azetyl-CoA zu H_2O und CO_2 unter gleichzeitiger Bildung großer Mengen ATP, NADH und Wärme.

Die Glykolyse stellt den zentralen Prozess beim Abbau der Kohlenhydrate in Stufe zwei dar. Die aus dem vorhergehenden Schritt stammenden Glukose-Untereinheiten (6 C-Atome) werden zu zwei Molekülen Pyruvat (3 C-Atome) abgebaut, energetisch gesehen resultieren dabei 2 ATP und 1 NADH, durch die Umwandlung von NAD^+ in NADH. Unter aeroben Bedingungen schließt sich die Weiterverarbeitung von Pyruvat im Citrat-Zyklus innerhalb der Mitochondrien an. Unter anaeroben Bedingungen findet stattdessen ein als Fermentation (Gärung) bezeichneter Prozess statt, bei dem Pyruvat abhängig vom Organismus z.B. zu Ethanol und CO_2 (Hefen) bzw. abhängig vom Gewebetyp zu Laktat (Skelettmuskel)

verarbeitet wird. Im anaeroben Medium ist die Glykolyse der zentrale ATP-Generator (Stryer, 1996).

Der dritte Abschnitt des Katabolismus ist nur unter aeroben Bedingungen möglich. Zu Beginn desselben steht der Krebs-Zyklus. Im Verlauf des zyklischen Abbaus der Azetyl-Gruppe von Azetyl-CoA über Zitronensäure bis zur Regeneration des Azetyl-Akzeptors Oxalacetat entstehen energiereiche Verbindungen in Form von 1 GTP (alle Triphosphat-Nukleoside sind auf Grund der Reaktion GTP + ADP = GDP + ATP als energetisch equivalent anzusehen). Die verbleibende Energie wird in die Reduktion Wasserstoff transportierender Moleküle kanalisiert: 3 $NAD^+ \rightarrow$ 3 NADH, 1 FAD $\rightarrow$ 1 $FADH_2$. Als Abfallprodukt resultieren außerdem 2 Moleküle CO_2.

An letzter Stelle des Katabolismus steht die oxidative Phosphorylierung: 30 der insgesamt 36 ATP Moleküle, die bei der Oxidation von Glukose zu CO_2 und H_2O anfallen, werden in diesem Abschnitt gebildet. Vereinfacht gesagt entspricht die hier ablaufende Reaktion einer Übertragung von Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser:

$$H_2 + ½\ O_2 \rightarrow H_2O$$

Trotz Komplexität ist die ATP Ausbeute der vorhergehenden Schritte (Glykolyse und Citrat-Zyklus) eher unbedeutend. Die Funktion von Glykolyse und Citrat-Zyklus besteht jedoch vielmehr darin, die in Glukose gespeicherten Wasserstoffatome in eine oxidationstaugliche Form zu bringen, damit diese im letzten Abschnitt des Katabolismus als treibende Kraft der ATP Synthese wirken können (Gyton und Hall, 1996). Träger der freiwerdenden Elektronen ist in jedem Fall entweder NAD^+ oder FAD. Beiden kommt als recycelbares Transportsystem die Aufgabe zu, Elektronen (Wasserstoffatome) vom Ort ihrer Synthese zur Atmungskette zu bringen. Die Übertragung von Substrat-Wasserstoff auf NAD^+ entspricht immer dem gleichen Prinzip:

$$\text{Substrat}\begin{matrix} \diagup H \\ \diagdown H \end{matrix} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Dehydrogenase}} NADH + H^+ + \text{Substrat}$$

In den der oxidativen Phosphorylierung vorausgehenden Schritten werden insgesamt 24 Wasserstoff-Atome frei, die immer paarweise an das externe Medium abgegeben werden. 20 Wasserstoff-Atome werden prompt von NAD^+ in einem von Dehydrogenasen katalysierten Schritt eingefangen (Gyton und Hall, 1996). Genauer betrachtet dissoziieren die

freiwerdende Wasserstoff-Atome in wässriger Lösung erst spontan in ein Elektron (e^-) und ein positiv geladenes Hydrogen-Ion (Proton), bevor es zur Interaktion mit NAD^+ kommt. Das positiv geladene Proton verbleibt in der wässrigen Lösung. Das Elektron wird von Elektronenträgern eingefangen und Richtung Elektronentransportkette (Atmungskette) kanalisiert. NADH transportiert aber nicht ausschließlich ein Elektron, sondern ein Wasserstoff-Atom plus ein Elektron (Hydrid-Ion) (Alberts et al., 2004). Die reduzierte Form NADH ist weniger stabil als die oxidierte Form NAD^+. Das erworbene Hydrid-Ion wird baldmöglichst auf andere Carrier-Moleküle übertragen, wodurch die Atmungskette einerseits in Gang gesetzt wird und NAD^+ in seiner regenerierten Form erneut als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht.
Letztendlich reagieren die über die Elektronentransportkette gelaufenen Elektronen mit im externen Medium gelösten Protonen und Sauerstoff unter Bildung von Wasser:

$$2e^- + 2H^+ + ½\ O_2 = H_2O.$$

Die Passage der von NADH abgegebenen Elektronen durch die Elektronentransportkette ist die notwendige Voraussetzung, um die in Elektronen gespeicherte elektrische Energie in die physiologisch nutzbare Energieform ATP umzusetzen.
Die Atmungskette besteht aus einer Reihe von Carriermolekülen, die je nach Autor in drei bzw. fünf multimerische Haupt-Enzymkomplexe (Komplex I-V) gegliedert wird. Diese Enzymkomplexe befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran. Ihre Aufgabe besteht darin, die von NADH abgegebenen Elektronen auf O_2 zu übertragen (Stryer, 1988). Auf jeder Stufe des Transfers fallen die Elektronen in einen niedrigeren Energiezustand. Die dabei freiwerdende Energie wird dazu genutzt, Protonen aus der Mitochondrienmatrix durch die innere Mitochondrienmembran in den intermembranären Raum zu pumpen. Der so entstandene Anstieg der Protonen Konzentration ist die Grundlage für den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran (Ladungs- und pH Differenz) (Alberts et al., 2004).
Die Aufklärung des lange Zeit unverständlichen Zusammenhangs zwischen Atmungskette und ATP Synthese geht auf die Arbeiten von Mitchell und Mitarbeiter (1961) zurück. Anhand der „chemi-osmotischen Hypothese“ konnte nachgewiesen werden, dass der energetisch günstige Elektronentransport an die energiekonsumierende Protonenpumpe gekoppelt ist. Der Protonenrückfluss entlang des Gradienten liefert die nötige Aktivierungsenergie für das Enzym ATP Synthase (Komplex V), welches die Reaktion ADP + anorganisches Phosphat $\rightarrow$ ATP katalysiert.
Die von den Enzymkomplexen transportierten Elektronen reagieren mit molekularem Sauerstoff zur Bildung von H_2O, damit ist die oxidative Phosphorylierung abgeschlossen.

NAD^+ fungiert als Cosubstrat der sogenannten Oxidoreduktasen (Dehydrogenasen). Diese katalysieren die Abspaltung von Substratwasserstoff, der wiederum von den Coesubstraten aufgenommen wird. Dehydrogenasen spielen eine wichtige Rolle im Intermediärstoffwechsel, u.a. bei Glykolyse und Gärung.

Das von einem Substrat stammende Elektron wird auf NAD^+ übertragen, wodurch dieses von seinem oxidierten Grundzustand in die reduzierte Form NADH übergeht. NAD^+ ist der wichtigste Elektronencarrier des Intermediärstoffwechsels und vermittelt als solcher zwischen den Prozessen, die gemeinsam den Stoffwechsel bilden. Am aktivsten ist diese Transportfunktion zwischen Krebs-Zyklus und oxidativer Phosphorylierung. Letztere ist für den Energiehaushalt besonders wichtig, da währenddessen ca. 95% des Energiebedarfes eukarioter Zellen produziert werden (Erecinska et al., 1982).

2.1.2. Strukturanalyse von NADH

NADH zählt zur Gruppe der Coenzyme. Dabei handelt es sich um nicht proteinogene organische Stoffe, die eine mehr oder weniger feste Bindung mit den eigentlichen Enzymen eingehen.

Coenzyme fungieren als Carriermoleküle, d.h. sie agieren als Akzeptor oder Donator jener Komponenten, die für die jeweilige Reaktion benötigt werden (Elektronen, Wasserstoffatome, Phosphorgruppen etc.) (Alberts et al., 1989)
Hier einige Beispiele:
Wasserstoffübertragende Coenzyme: NAD^+, $NADP^+$, FAD^+
Gruppenübertragende Coenzyme: ATP (Phosphatgruppe), CoA (Acetylgruppe).

Viele Coenzyme enthalten Vitamine als Bestandteil ihrer Struktur. Im Falle von NAD^+ und $NADP^+$ stellt Vitamin B_3 (Nicotinamid) diesen Grundbaustein dar. Ein Defizit dieses Vorläufers führt beim Menschen zum Krankheitsbild der Pellagra (Mahler und Cordes, 1966). 1915 wurde Pellagra von Goldberger als eine Mangelerscheinung erkannt, die durch entsprechende Ernährung (Leber, Fleisch, Hefe, Vollkornbrot) vermieden werden kann. 1937 isolierte Elvehjem aus Lebergewebe einen bei Pellagra wirksamen Faktor (PP-Faktor = Pellagra praeventium) und identifizierte diesen als Nicotinsäureamid.
Genaugenommen zählt Vitamin B_3 gar nicht zur Gruppe der Vitamine, die per definitionem komplett von außen zugeführt werden müssen, da ca. 2/3 des Nicotinamidbedarfs aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert werden.

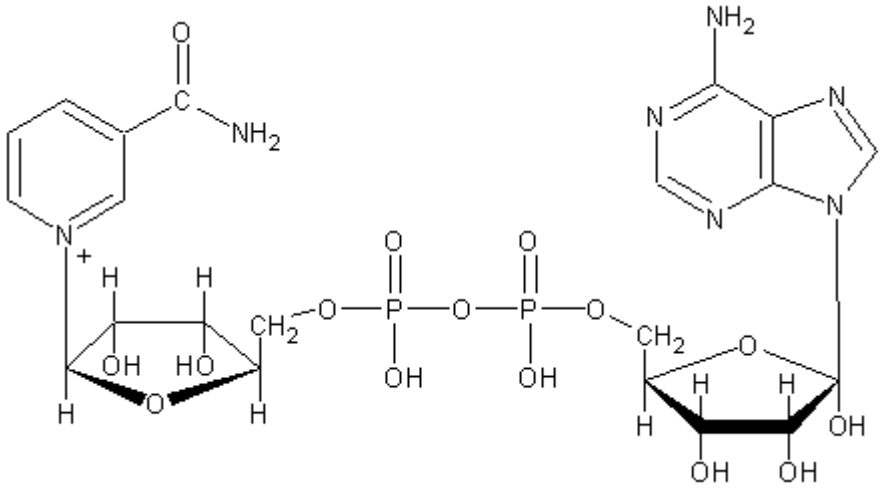


Abb. 1: Strukturformel von NADH

Die Aufklärung der Strukturformel von NADH verdanken wir den Forschungsarbeiten von Euler und Warburg (1931), welche zum damaligen Zeitpunkt die Bezeichnung Coenzym I wählten. Der später gebräuchliche Terminus Diphospho-pyridin-nucleotid (DPN) wurde nach Einführung der neuen Nomenklatur durch Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+) ersetzt (Mahler und Cordes, 1966). NADH gehört zur Gruppe der Dinukleotide. Es besteht aus einem Molekül Nicotinamid und einem Molekül Adenin, die über 2 Moleküle Ribose und ein Molekül Phosphorsäure miteinander verbunden sind.

Der reaktive Teil dieses Coenzyms befindet sich im positiv geladenen Nicotinamidring (Pyridinring); hier findet die reversible Wasserstoffübertragung in Form eines Hydrid-Ions (Elektrons) statt (Auterhoff, 1994). Das vorher positiv geladene NAD^+ wird in seine elektrisch neutrale, reduzierte und energiereichere Form NADH überführt. NADH ist instabiler als NAD^+ und besitzt folglich die Tendenz, seine eben erworbene Last schnellst möglichst an andere Substanzen abzugeben. Auf diesem Phänomen beruht die Eigenschaft des NAD^+ als Elektronenüberträger.

Ein wichtiges Strukturanalogon von NADH ist dessen phosphorylierte Form Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH). NADPH ist im Unterschied zu NADH an der OH-Gruppe in 2' –Stellung der Ribose-Untereinheit mit Phosphorsäure verestert (Stryer, 1996). Die zusätzliche PO_3 Gruppe befindet sich räumlich weit entfernt vom reaktiven Teil des Moleküls (Nicotinamidring) und hat deshalb weder einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften noch auf die Funktion als Elektronenüberträger. Sie dient jedoch als Verbindungsglied an jene Enzyme, für die NADPH als Coenzym notwendig sind. Durch den Vorgang der Phosphorylierung ist deshalb die selektive Wirkung beider Coenzyme garantiert. Generell gesehen katalysieren NAD^+-gebundene Dehydrogenasen Redoxreaktionen des oxidativen Stoffwechsels (Katabolismus), während $NADP^+$-gebundene Dehydrogenasen hauptsächlich an Stoffwechselprozessen reduktiven Charakters (Biosynthese) beteiligt sind (Stryer, 1988) .

2.1.3. Spektroskopische Eigenschaften von NAD^+/NADH

Der Gedanke, NADH aufgrund seiner spektroskopischen Eigenschaften als Markermolekül für die im Organismus, einschließlich im Gehirn, ablaufenden metabolischen Prozesse heranzuziehen, ist nicht neu. Erste Forschungsarbeiten, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzten, wurden von Chance und Mitarbeitern 1962 durchgeführt.

NADH ist ein natürlich vorkommendes Fluorophor. Die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge λ = 360nm löst ein blaues Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei λ =

465nm aus. Die oxidierte Form NAD^+ sendet im Wellenlängenbereich von 360nm kein Fluoreszenzlicht aus. NADH und NAD^+ unterscheiden sich in ihren optischen Eigenschaften deshalb voneinander, weil die aromatische Natur des Pyridinringes durch die Hydrierung verloren geht. In der dehydrierten Form liegt der Stickstoff des Nicotinamidringes als Pyridiniumkation vor. Bei Wasserstoffaufnahme wird der Pyridinring reduziert, so dass er nur noch zwei Doppelbindungen enthält; der Stickstoff verliert seine positive Ladung. Gleichzeitig wird ein Wasserstoffion frei (Rapoport, 1975).

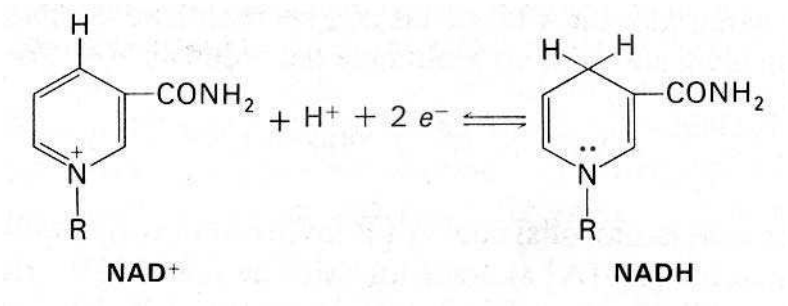


Abb.2: Hydrierung des Nicotinamidringes

Sowohl NAD^+ als auch NADH weisen jedoch eine auf das Adenin zurückzuführende Lichtabsorption bei λ=260 nm auf, welche sich beim Hydrierungsvorgang nur gering ändert. (Rapoport, 1975). Somit lässt sich zum einen der Übergang von $NAD^+ \rightarrow$ NADH optisch verfolgen und, da die Intensität des Fluoreszenzsignals proportional zur NADH Konzentration ist (Pfeifer et al., 1996, Beyer und Walter, 1991), können anhand der Signalinterpretation direkte Rückschlüsse auf den Status Zellmetabolismus vorgenommen werden.

Prinzipiell existieren neben NADH noch andere physiologisch vorkommende Fluorophore, z.B. Riboflavine (FMN und FAD), NADPH, aromatische Aminosäuren, Kollagen und Elastin sowie Pyridoxal Derivate (Lakowicz, 1999). Bei der Analyse der Fluoreszenzstrahlung von NADH sind falsch positive Daten durch die Aufzeichnung von Fremdfluoreszenz anderer endogenen Fluorophore jedoch aufgrund folgender Überlegungen weitgehend auszuschließen: die mengenmäßig dominierenden Fluorophore im tierischen Gewebe beschränken sich auf NADH und Flavine (Lakowicz, 1999). NADPH kommt laut Studien von Klaidman und Mitarbeitern (1995) im Kortex, dem Gewebe, an dem wir unsere Untersuchungen durchführten, nur in vernachlässigbar kleinen Mengen vor. Kollagen kommt im zentralen Nervensystem nicht vor, sondern umschließt als Perineurium ausschließlich Nervenfasern des peripheren Nervensystems. Eine Überschneidung der Fluoreszenzstrahlung von NADH und Flavinen ist ebenfalls unwahrscheinlich, da sich

charakteristische Parameter wie Emissionswellenlänge und Fluoreszenzlebensdauer deutlich unterscheiden (Lakowicz, 1999):

Substanz	Absorptionswellenlänge	Emissionswellenlänge	Fluoreszenzlebensdauer (ns)
NADH	340nm	460nm	0,4ns
NADPH	340nm	460nm	2ns
FAD	450nm	525nm	2,3ns
FMN	450nm	525nm	4,7ns
Kollagen	<340nm	405nm	langlebig

Tabelle 1: physiologisch vorkommende Fluorophore und deren charakteristisch spektroskopische Merkmale

Man kann deshalb davon ausgehen, dass ein im Kortex gemessenes Fluoreszenzsignal von 460nm nach Bestrahlung mit Anregungslicht der Wellenlänge 340nm wahrscheinlich grösstenteils von NADH ausgeht (Renault et al., 1982).
Es kann keine gesicherte Aussage darüber gemacht werden, ob das registrierte Fluoreszenzsignal von Gliazellen oder von Neuronen stammt. Aufgrund der charakteristischen Unterschiede im Stoffwechsel beider Zelltypen -Gliazellen zeigen einen vorwiegend glykolytisch, Neuronen einen ausgeprägt oxidativen Metabolismus- besteht jedoch die Annahme, dass die im Kortex registrierten Fluoreszenzsignale hauptsächlich aus neuronalen Zellen stammen (Ames, 2000).
Das Gehirn macht etwa 2,5% der Körpermasse aus und beansprucht 20% des Gesamtsauerstoffbedarfes. Der Grossteil der vom Hirn benötigten Energie wird zur neuronalen Signalübertragung verwendet. Studien mit radioaktiv markierter Glukose ergaben, dass etwa 60-75% der Gesamtenergie auf Glutamat-vermittelte exzitatorische Neurotransmission entfällt, wohingegen nur 10-15% auf GABA-vermittelte Reizleitung und 10-15% für den Stoffwechsel von Gliazellen benötigt werden (Shulmann et al. ,2004).
Bis vor kurzem wurde angenommen, dass zur Energiegewinnung im Gehirn ausschließlich Glukose verwendet wird. Unter Bestimmung der NADH Fluoreszenz -als Ausdruck des oxidativen Stoffwechsels- wurde festgestellt, dass Laktat, v.a. in Astrozyten, möglicherweise auch als Energiequelle genutzt werden kann (Pellerin et al., 2004).

2.1.4. Vorkommen von NADH

Im Intrazellulärraum kommt NADH sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vor. Im Vollblut befindet sich NADH ausschließlich innerhalb der zellulären Komponenten (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) (Klingenberg, 1974). Im Extrazellulärraum (Zerebrospinalflüssigkeit) konnte kein NADH-typisches Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Mottin et al., 1997).
Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass im Intrazellulärraum die mitochondriale NADH Fraktion quantitativ überwiegt. Jöpsis und Mitarbeiter (1970) führten vergleichende Untersuchungen der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Katze und an isolierten Mitochondrien durch. Die Ergebnisse wurden durch NADH Konzentrationsmessungen aus Kortexproben ergänzt. Die NADH Fluoreszenz- und Konzentrationsmessungen wurden unter anoxischen und normoxischen Bedingungen, sowie unter paroxysmalen Krampfanfällen durchgeführt. Fluoreszenzzunahmen konnten bei allen Versuchen mit einer erhöhten intramitochondrialen NADH Konzentration korreliert werden, Fluoreszenzabnahmen hingegen mit einer erhöhten intramitochondrialen NAD^+ Konzentration.
Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch verschiedene Untersuchungen des Zellstoffwechsels: Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung (Natriumzyanid, Amytal und Chloramphenicol) verursachten eine Zunahme der NADH Fluoreszenz, während 2,4 Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, eine Abnahme der NADH Fluoreszenz auslöste (Riepe et al., 1996; Rex et al., 1999; Mottin et al., 2003).
Man geht deshalb davon aus, dass die durch spektroskopische Methoden gemessenen NADH Fluoreszenzsignale in erster Linie dem Intrazellulärraum entstammen, bzw. hauptsächlich die intramitochondriale Konzentration von NADH widerspiegeln.

Auf Lakowicz und Mitarbeiter (1992) geht die Beobachtung zurück, dass die Fluoreszenzstrahlung von NADH zudem durch Bindung des Coenzyms an Proteine gesteigert werden kann. Diese Tatsache erklärt auch, warum intramitochondriales NADH, das fast ausschließlich in proteingebundener Form vorliegt, ein doppelt so starkes Fluoreszenzsignal als das vorwiegend ungebundene zytoplasmatische NADH emittiert. Letzteres bewegt sich frei im Zytosol und verliert durch Kollision mit Nachbarmolekülen (v.a. O_2) einen Teil seiner Energie als Wärme und nicht als Fluoreszenzstrahlung. Da größtenteils an Proteine gebunden, ist das mitochondriale NADH relativ unbeweglich, die Kollision mit anderen Molekülen ist deshalb unwahrscheinlicher.

Aufgrund seiner zentralen Rolle im Stoffwechsel und der heute möglichen Nachweismethoden eignet sich NADH besonders gut als Markermolekül des Zellmetabolismus. Veränderungen der NADH Konzentration spiegeln Veränderungen des intrazellulären Redoxzustandes, Verbrauch der in NADH gespeicherten Energie, Sauerstoffmangel sowie Störungen der Atmungskette wider. Die Möglichkeit, NADH als Bioindikator zu nutzen, wird in der klinischen Chemie schon seit längerer Zeit erfolgreich angewandt. Eine Zunahme der NADH Fluoreszenz ist ein Hinweis auf eine verminderte Stoffwechselaktivität und einem daraus resultierenden reduziertem NADH Verbrauch (Dora et al.,1984), wohingegen eine Abnahme der NADH Fluoreszenz gleichbedeutend mit einer gesteigerten metabolischen Aktivität ist (Mayevski et al., 1996). Besonders anschaulich ist diese Tatsache im Moment des Exitus letalis sichtbar. Der Zellmetabolismus kommt zu einem völligen Stillstand, die Atmungskette ist unterbrochen, es findet kein Verbrauch von NADH mehr statt, eine maximale Akkumulation desselben ist die Folge (Mottin el al., 2003).

2.2. Mögliche therapeutische und diagnostische Einsatzgebiete von NADH

Die Signalübertragung im zentralen Nervensystem ist eng an die Leistung des Energiestoffwechsels, d.h. an die mitochondriale Aktivität gekoppelt (Ames, 2000).
Auf Grund der Verflechtung zwischen Energiestoffwechsel und NADH sind in Folge metabolischer Störungen auch Veränderungen der NADH Konzentration, sowie Beeinträchtigung der neuronalen Funktionen zu erwarten. Da diese Art Störungen grundsätzlich jedes Organ befallen können, und der Energiemetabolismus grundlegender Ausdruck jeder Form von zellulärer Vitalität ist, ist auch verständlich, warum die Forschungsansätze, die sich mit der therapeutischen und diagnostischen Anwendung von NADH auseinandersetzen, ein derart breites Gebiet (Mitochondriopathien, Einsatz als Antidepressivum und Antihypertensivum, Tumordiagnostik etc.) umfassen.

2.2.1. Mitochondriale Erkrankungen

Auf Grund der zentralen Rolle, die die Mitochondrien im Zellstoffwechsel spielen, kann eine Störung der Mitochondrienfunktion von schweren pathologischen Folgen begleitet sein. In den 60er Jahren wurden erste Forschungen auf diesem Gebiet begonnen (Luft, 1962), seitdem wurden etwa 120 Mitochondriopathien identifiziert. Mitochondriopathien sind klinisch, biochemisch und genetisch heterogene Erkrankungen, die auf Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels beruhen (Definition: Deutsche Gesellschaft für Neurologie und Mitochondriale Erkrankungen). Betroffen sind vor allem Organsysteme mit einem hohen Energie- und Sauerstoffbedarf (Gehirn, Skelettmuskel) (Löbert, 2003).
Die zugrunde liegenden erblichen oder erworbenen mitochondrialen DNA (mt DNA) Mutationen bewirken ein Funktionsdefizit des lokalen Energiestoffwechsels, v.a. der oxidativen Phosphorylierung und des Fettsäureabbaus. Aufgrund der unterschiedlichen genetischen Defekte, die eine Mitochondriopathie bedingen können, ist die klinische Manifestation sehr vielfältig, weshalb sich Klassifizierung und Diagnostik mangels charakteristischer Symptome schwer gestalten. Eine eindeutige Diagnose ist oft nur durch *post mortale* Untersuchungen möglich.
Mitochondriale Funktionsstörungen haben sich in den vergangenen Jahren, neben anderen Ursachen, als kausale Faktoren in der Pathogenese neurodegenerativer und neurometabolischer Erkrankungen beim Menschen herausgestellt (Byrne, 2002). Die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, denen eine Mitochondrienbeteiligung

zugesprochen wird, sind Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer. Beide sind vom ätiologischen und vom pathogenetischen Standpunkt noch nicht hinreichend geklärt, es existiert jedoch eine Fülle von Beweismaterial (Orth und Schapira, 2002, Swerdlow et al., 1996, Beal et al., 1993 und Beal 1995, Bowling et al., 1995, Kish et al., 1992, Parker et al., 1994), die für eine Mitochondrienbeteiligung am pathogenetischen Geschehen beider Krankheiten sprechen. Auch der physiologische Alterungsprozess ist, zumindest teilweise, durch Veränderungen auf Mitochondrienniveau hervorgerufen bzw. von diesen begleitet. Es existieren Parallelen zwischen normalem Alterungsprozess und neurodegenerativen Erkrankungen, deren Aufklärung nicht nur Informationen zur Pathogenese derselben liefern könnten, sondern vor allem wichtig für die Ausarbeitung eventueller therapeutischer Maßnahmen wäre.

Auch in der Tiermedizin, vor allem im Bereich der Kleintiermedizin, wird die Existenz von Mitochondriopathien diskutiert. Allerdings beschränken sich die verfügbaren Daten hier auf Einzelfallbeschreibungen. Klinisch äußern sich Mitochondriopathien wie beim Menschen in Form von Myopathien oder Enzephalopathien (Löbert, 2003). Die Patienten, vor allem Hunde, wurden meist wegen einer anstrengungsabhängigen Schwäche oder aufgrund neurologischer Störungen vorgestellt. In der Blutanalyse gab es häufig Hinweise auf eine Laktazidose. Bei den Patienten mit neurologischen Störungen konnte histologisch eine subakute nekrotisierende Enzephalopathie festgestellt werden, die in einigen Fällen von Kavitation verschiedener Hirnareale begleitet war. Die Patienten, bei denen eine Myopathie diagnostiziert wurde, zeigten Defekte verschiedener mitochondrialer Enzyme (Houlton et al., 1980, Vijayasarathy et al., 1994), bei anderen Patienten wurde eine erhöhte Anzahl morphologisch abnormaler Mitochondrien festgestellt (Brenner et al., 1997).

2.2.2. Physiologischer Alterungsprozess

Mit zunehmendem Alter steigt die Rate der mitochondrialen DNA Mutationen exponentiell an. Da die mitochondriale DNA für subzelluläre Komponenten innerhalb der Mitochondrien kodiert, führen die genannten Mutationen ab einem gewissen Ausmaß zu funktionellen Störungen der Elektronentransportkette. Eine vermehrte Produktion freier Radikale (v.a. $^{\cdot}OH$ und $^{\cdot}ONOO$) ist die Folge. Der menschliche Körper verfügt physiologischerweise über ein System antioxidativer Schutzmechanismen wie Glutathion Peroxidase, Glutathion Reduktase, Katalase, Superoxid Dismutase, antioxidative Enzyme, die den Schaden zu einem gewissen Grad begrenzen können. Die vermehrte Produktion freier Radikale setzt jedoch einen circulus vitiosus in Gang, bei dem die oxidative Schädigung wichtiger zellulärer

Proteine, Fette und DNA wiederum eine gesteigerte Radikalproduktion nach sich zieht (Enns, 2003). Barrientos und Mitarbeiter (1999) konnten nachweisen, dass eine direkte quantitative Korrelation zwischen freier Radikalproduktion und Apoptoserate besteht.
Zarchin und Mitarbeiter (2002) untersuchten an Ratten, wie sich der Alterungsprozess auf den Energiestoffwechsel auswirkt. Jüngere Tiere reagierten auf Anoxie mit einer Zunahme der NADH Konzentration um 36±2%, wohingegen bei alten Tiere nur eine NADH Konzentrationszunahme um 9±4% zu registrieren war. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, dass im gealterten Hirn strukturelle und funktionelle Veränderungen stattgefunden haben, die eine adequate Reaktion der Mitochondrien auf anoxische Bedingungen nicht möglich machen.
Mitochondrien werden als „Schrittmacher“ des Alterungsprozesses angesehen, da in ihnen die Hauptproduktion freier Radikale stattfindet, was wiederum eine Störung der oxidativen Phosphorylierung, des Elektronen Transportes, sowie verschiedener mitochondrialer Enzyme nach sich zieht (Sohal, 1993).

Es existiert eine direkte Beziehung zwischen Alterungsprozess, reduzierter neurologischer Aktivität und zerebralem oxidativem Stress.
In Verhaltensversuchen mit Mäusen konnte nachgewiesen werden (Navarro, 2004), dass die Lebenserwartung der Tiere durch erhöhte neurologische Aktivität (Zunahme um 8-10%), Bewegung (Zunahme um 21-15%) sowie durch Zufütterung von Vitamin E (Zunahme um 25-20%) im Vergleich zu Kontrollgruppen gesteigert werden kann. Die beobachtete Zunahme der Lebenserwartung korrelierte mit der Abnahme oxidativer Stress Marker (Carbonyl Proteine, Peroxid Radikale u.a.) im Gehirn.

2.2.3. Morbus Parkinson

Die Mehrheit der Parkinsonerkrankungen tritt spontan auf, nur einige wenige sind auf erbliche Faktoren oder Einwirkung von Umweltgiften wie z.B. Kohlenmonoxid, Mangan und MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) (Orth et al., 2002) zurückzuführen. Morbus Parkinson (MP) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters. Histologisch steht ein Untergang dopaminerger Neurone, vor allem in der Substantia nigra, im Vordergrund. Symptomatisch äußert sich dieser Verlust in Form einer pathognomonen Trias von Akinese, Rigor und Ruhetremor.
Aus biochemischer Sicht liegt in erster Linie eine Funktionsstörung des Komplex I der Elektronentransportkette, der Neuronen der Substantia nigra vor, allerdings ist noch nicht geklärt, ob auch andere Strukturen (Skelettmuskel und Thrombozyten) und Enzymkomplexe

(II und III) regelmässig betroffen sind oder nicht (Orth et al., 2002). Zum Zeitpunkt des symptomatischen Ausbruchs sind etwa 50-70% der dopaminergen Neurone der Substantia nigra zugrunde gegangen.

Bestimmte Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind, können als Marker für oxidativen Stress herangezogen werden. Im Falle von Parkinson wurden folgende Substanzen und Konzentrationsänderungen als Marker vorgeschlagen:

- Eine Zunahme der Eisenkonzentration in der Substantia nigra,
- Eine Abnahme der Glutathion-Konzentration in der Substantia nigra.

Riederer und Mitarbeiter (1989) führten Untersuchungen zur regionalen Verteilung von Eisen, Magnesium, Kupfer, Zink und anderen Metallen post mortem an Gehirnen von Patienten durch, die die Krankheit in unterschiedlicher Ausprägung aufwiesen. In Hirnpräparaten von Patienten, die an einer milden Form von Parkinson litten, wurden keine Unterschiede in der regionalen Verteilung der untersuchten Substanzen im Vergleich zu Hirnschnitten von nicht an Parkinson leidenden Patienten festgestellt. Patienten, die an einer schweren Form des Morbus Parkinson litten, wiesen dagegen eine Zunahme der absoluten Eisenkonzentration sowie eine Verschiebung des Fe^{2+}/Fe^{3+} Verhältnisses zu Gunsten von Fe^{3+} auf. Eisen (Fe^{3+}) begünstigt über die Fenton Haber-Weiss Reaktion die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in freie Hydroxylradikale (Schulz, 2000). Außerdem wurde eine Verminderung der Glutathion-Konzentration in der Substantia nigra festgestellt. Dopamin kann in Gegenwart von Eisen und anderen Schwermetallen autoxidieren, was zu einem Anstieg freier Radikale führt (Montgomery,1995). Perry und Mitarbeiter (1992) untersuchten autopsierte Gehirne von Parkinson Patienten und nicht an Parkinson leidenden Patienten auf das quantitative Vorhandensein von Glutathion. Das menschliche Gehirn ist relativ defizitär an anti-oxidativen Schutzmechanismen (Martilla et al., 1988) und ist deshalb besonders anfällig für Schädigungen durch oxidativen Stress. Bei den Kontrollgruppen war Glutathion in der Substantia nigra in einer signifikant geringeren Konzentration als in den übrigen Hirnregionen vorhanden, bei Parkinson Patienten war Glutathion in der Substantia nigra jedoch praktisch nicht nachweisbar.

Aufgrund der wichtigen Rolle, die Glutathion im körpereigenen anti-oxidativen Schutzmechanismus spielt, könnte diese Beobachtung wichtige Hinweise für pathogenetische und therapeutische Gesichtspunkte liefern.

Parkinson ist zur Zeit weder heilbar noch in zufriedenstellendem Maße therapierbar. Es gibt verschiedene Forschungsansätze zur Ergänzung der teilweise mit schweren Nebenwirkungen behafteten Levo-Dopa Behandlung:

Der letzte Schritt in der Dopaminsynthese, die Umwandlung von Levo-Dopa zu Dopamin, wird von Tyrosin Hydroxylase katalysiert, das als geschwindigkeitsbegrenzender Faktor eine Schlüsselrolle in diesem Prozess einnimmt. NADH wiederum beeinflusst dieses Enzym auf indirekte Weise. Tyrosin Hydroxylase benötigt zum optimalen Funktionieren den Cofaktor Tetrahydrobiopterin. Dieser liegt in inaktiver Form als Dihydrobiopterin vor. Der Übergang von der inaktiver in die aktive Form wird durch das Enzym Dihydropteridin Reduktase kontrolliert. NADH fungiert als Coenzym der Dihydropteridin Reduktase.

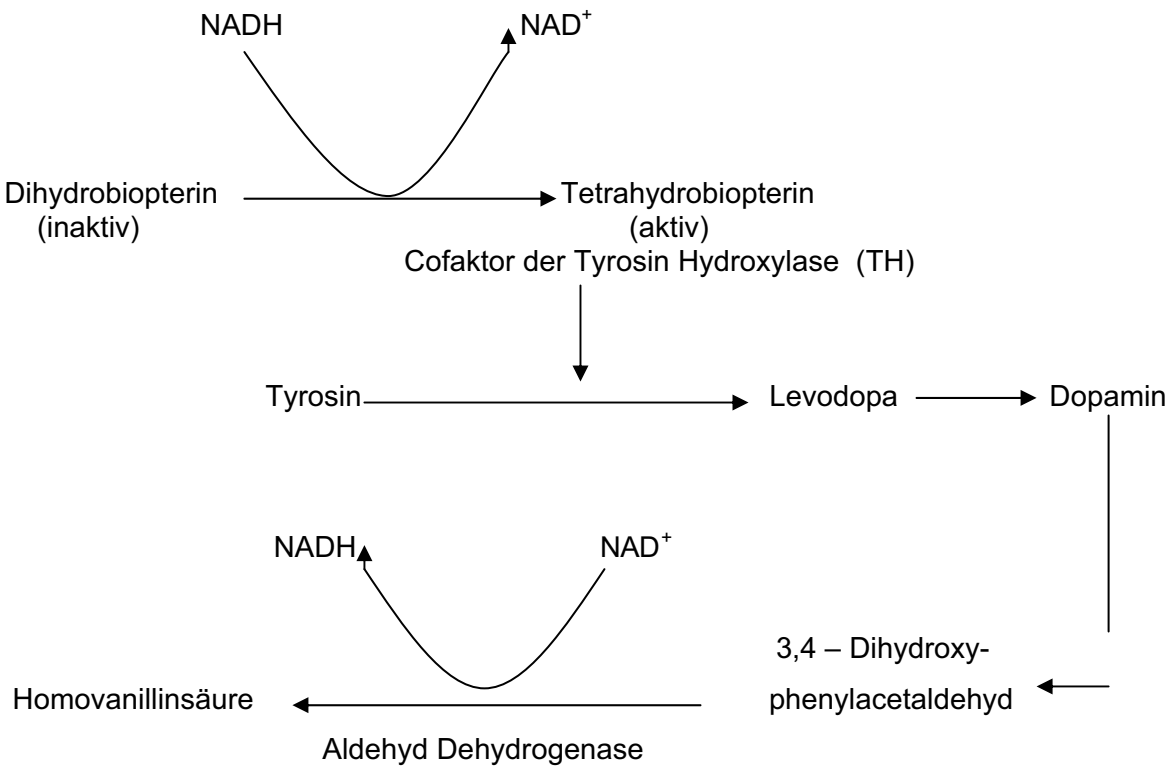


Abb.3: Vereinfachte Darstellung der Rolle von NADH bei Synthese und Abbau von Dopamin

Vrecko und Mitarbeiter konnten 1997 in vitro an Phaeochromocytom Zellen nachweisen, dass die Inkubation mit NADH zu einem signifikanten Anstieg der Dopaminkonzentration führt, was mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Rolle des NADH als Cofaktor für das Enzym Dihydropteridin Reduktase zurückzuführen ist.

Die therapeutische Wirkung von NADH bei Parkinson Patienten wurde bereits mehrfach untersucht. Es muss angemerkt werden, dass fast alle „NADH favorisierenden“ Studien aus dem Birkmayer Labor, Wien stammen. NADH wird von Birkmayer in den USA bereits

vermarktet und zur Bekämpfung von Parkinson, Alzheimer sowie Müdigkeit (jet lack) empfohlen (www.enada.com).

Birkmayer und Mitarbeiter haben mehrere offene Studien durchführt, deren Ziel es war, die Wirkung von NADH an Parkinson Patienten zu untersuchen.

1989 beispielsweise wurden 161 Parkinson Patienten NADH 25mg über einen Zeitraum von 10-14 Tagen intravenös verabreicht. Nach einer Pause von zwei bis drei Wochen wurde das Therapieregime wiederholt. 71% der Patienten zeigten über einen Zeitraum von 1-7 Tagen eine sehr gute symptomatische Verbesserung. Bei 30% der Patienten wurde eine moderate Verbesserung konstatiert. 11,2% sprachen nicht auf die NADH Therapie an. In der Gruppe der sehr guten Ergebnisse wurde zusätzlich bei 28 Patienten am Tag vor Therapiebeginn, sowie einen Tag nach Eintritt symptomatischer Verbesserung die Konzentration von Homovanillinsäure (HVS) im Urin bestimmt. Diese war bei allen 28 untersuchten Patienten erhöht. Die Erhöhung der HVS nach NADH Verabreichung war laut Birkmayer im gleichen Größenordnungsbereich, wie nach L-Dopa Gabe. Diese Angaben sind jedoch verwirrend, da einige der an der Studie teilnehmenden Patienten weiterhin ihre gewohnte Parkinson Therapie erhielten. Bei anderen war es unter NADH Gabe, aufgrund der eintretenden symptomatischen Verbesserung möglich die L-Dopa Dosis zu verringern, bzw. bei 15 Patienten wurde L-Dopa sogar komplett abgesetzt. Aus dem genannten Artikel geht jedoch nicht klar hervor, ob die 28 Patienten, bei denen HVA im Urin kontrolliert wurde, auch diejenigen waren, bei denen L-Dopa abgesetzt, bzw. reduziert wurde.

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1993 untersuchten Birkmayer und Mitarbeiter an 885 Parkinsonpatienten die Wirkung von oral und intravenös verabreichtem NADH. Die pro Patient verabreichte Menge betrug 5mg. NADH wurde jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von 14 Tagen verabreicht. Die klassische Parkinson Therapie wurde währenddessen fortgesetzt. 19,3% der Patienten zeigten eine sehr gute, 58,8% eine moderate symptomatische Verbesserung, 21% sprachen nicht auf die NADH Therapie an. Die Ergebnisse nach oraler Verabreichung unterschieden sich nicht signifikant von denen nach intravenöser Verabreichung.

Birkmayer erklärt seine Beobachtungen damit, dass NADH stimulierend auf die Dopaminsynthese wirkt. Als Beweis werden Forschungsarbeiten von Nichol und Mitarbeiter (1985) sowie Vrecko und Mitarbeiter (1992 und 1997) angegeben.

Auf ersteren geht die Beobachtung zurück, dass NADH als Coenzym der Dihydropteridinreduktase fungiert (siehe auch S. 15f). Vrecko und Mitarbeiter konnten an Phaeochromocytomen Zellen, die einen den nigrostriatalen Zellen ähnlichen Stoffwechsel zeigen, nachweisen, dass die Inkubation mit 400μg NADH /ml zu einem dreifachen Anstieg der Dopaminkonzentration im Vergleich zu NADH freien Kontrollen führte (siehe auch S.16).

Birkmayer verweisst mehrfach auf eine in Planung befindliche doppel-blind Studie, in der die Ergebnisse der offenen Studien überprüft werden sollen. Auch nach intensiver Literaturecherche konnte ich jedoch keinen Hinweis auf Publikation einer solchen finden.
Die einzige doppel-blind Studie, die zur Untersuchung der Wirkung von NADH bei Parkinson Patienten durchgeführt wurde, stammt von Dizdar und Mitarbeitern (1994). Die Studie umfasste zwar nur 10 Patienten, und obwohl praktisch die gleichen Versuchsbedingungen wie in der Birkmayer Studie gewählt wurden (NADH 25mg/Tag intravenös 4 Tage lang, anschließend NADH 25mg intramuskulär am 20. und am 35. Tag im Vergleich zu Kontrollen, bei denen nach dem gleichen Schema isotone Kochsalzlösung verabreicht wurde sowie Beibehaltung der vorherigen Parkinson Therapie), konnten die Ergebnisse von Birkmayer nicht reproduziert werden. Eine Tendenz zur symptomatischen Verbesserung konnte sowohl in der NADH als auch in der Plazebo Gruppe beobachtet werden, die Veränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant.
Ebenso konnte die von Birkmayer (1989) postulierte Beobachtung, dass NADH (25mg/Tag täglich 11-15 Tage lang, bzw. jeden zweiten Tag IV verabreicht) die Homovanillinsäure (HVS) Konzentration im Urin steigert nicht bestätigt werden. Dizdar und Mitarbeiter (1994) analysierten die Konzentration von HVS in Liquor zerebrospinalis von 5 Parkinsonpatienten nach NADH Gabe (25mg/Tag 4 Tage lang intravenös verabreicht + NADH 25mg intramuskulär am Tag 20 und 35). Es konnte keine Veränderung der HVA Konzentration registriert werden.
Swerdlow (1998) warnt vor einer übereilig unfundierten positiven Interpretation der Wirkung von NADH bei Parkinson Patienten. Er weißt daraufhin, dass in der Pathogenese von Morbus Parkinson vorrangig Komplex I der Elektronen Transportkette (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase) funktionell eingeschränkt ist, nicht jedoch die Enzyme der Katecholaminsynthese (Orth und Schapira, 2001). Komplex I erhält Elektronen von NADH und überträgt diese auf Ubichinon. Während dieses Vorganges wird NADH oxidiert und steht erneut als Elektronenakzeptor NAD^+ zur Verfügung. Daraus folgt, dass eine Dysfunktion der NADH Ubichinon Oxidoreduktase automatisch zu einer Ansammlung von NADH führt, was wiederum bedeutet, dass bei Vorliegen eines Morbus Parkinson bereits ein Überschuss an NADH besteht. Vor diesem Hintergrund erscheint eine zusätzliche Gabe von NADH deshalb eher fraglich.
Swerdlow streitet die Wirkung von NADH nicht ab, er weißt jedoch darauf hin, dass die von Birkmayer aufgestellte Theorie bezüglich des Wirkmechanismus von NADH kritischer Überarbeitung bedarf. Denkbar wäre beispielsweise auch, dass NADH die Dopaminkonzentration durch Beeinflussung des Abbauenzyms Aledhyd-Dehydrogenase (siehe Abb. 3) verbessert.

2.2.4. Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist eine fortschreitende, neurodegenerative Erkrankung des Gehirns. Es ist die häufigste Form der Demenz. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Alter exponentiell an. Während in der Altersgruppe der 60 bis 70 jährigen unter 5% betroffen sind, sind in der Altersgruppe der über 80 jährigen mehr als 20%, einigen Studien zufolge sogar bis zu 35% betroffen (Bermejo, 1991). Die Krankheit tritt meist spontan auf. In ihrem Verlauf kommt es zu einer progredienten diffusen Hirnatrophie. Charakteristische histologische Läsionen sind senile Plaques und Amyloidablagerungen, die häufig von Astrozyten- und Microgliaproliferation begleitet sind. Biochemisch steht eine Störung der kortikalen cholinergen Reizleitung im Vordergrund. Als Ursache wird eine Verminderung der Cholinacetyltransferase diskutiert.

Auch bei Morbus Alzheimer wird die Möglichkeit einer Mitochondrienbeteiligung am pathogenetischen Geschehen seit längerem diskutiert. Kish und Mitarbeiter (1992) führten Messungen der Enzymaktivität der Cytochrom Oxidase (COX), einem terminalen Enzym der Elektronentransportkette (Komplex IV), in verschiedenen Hirnregionen autopsierter Gehirne von an Alzheimer und nicht an Alzheimer leidender Patienten durch. Folgende Beobachtung wurde dabei an von Alzheimer Patienten stammenden Gehirnproben gemacht:

COX-Aktivität im frontalen Kortex: - 26%

COX-Aktivität im temporalen Kortex: -17%

COX-Aktivität im parietalen Kortex: - 16%.

Arbeiten von Parker und Mitarbeiter (1994) bestätigen diese Beobachtung. Da die Aktivität der Atmungskettenenzyme einen direkten Einfluss auf den Energiemetabolismus hat, könnte eine derartige Aktivitätsminderung die neuronale Hypoaktivität bzw. den neuronalen Untergang teilweise bedingen.

Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass NADH im Rahmen der experimentellen Alzheimer Therapie eventuell als Supplement oder Therapeutikum zum Einsatz kommen könnte; mehrere am neuronalen Energiemetabolismus beteiligte Enzyme sind von NADH als Cofaktor abhängig.

Jacobs und Mitarbeiter (1985) untersuchten *post mortem* Gehirnschnitte von Patienten, die an Morbus Alzheimer und seniler Demenz vom Alzheimer-Typ litten, auf die Aktivität von NADH-Diaphorase (Komplex I der Atmungskette) sowie das Vorhandensein von Astrozyten. Die Analysen wurden an Proben aus Nucleus Amygdala, Kortex und Substantia innominata sublenticularis vorgenommen. In den Neuronen der Substantia innominata sublenticularis war die Aktivität der NADH-Diaphorase im Vergleich zu den Kontrollen, die nicht an Morbus Alzheimer erkrankt waren, erniedrigt, die Zahl der Astrozyten hingegen erhöht. Erstaunlicherweise waren sowohl die Enzymaktivität als auch die Astrozytenzahl in senilen

Plaques erhöht, was dafür spricht, dass die Bildung der senilen Plaques, zumindest phasenweise, von einer erhöhten Enzymaktivität begleitet ist.
Zubenko und Mitarbeiter (1990) wiesen pathologische Veränderungen der Cytochrom C Reduktase (Komplex IV) des endoplasmatischen Retikulums sowohl im Gehirn als auch in Thrombozyten von Alzheimer Patienten nach. NADH ist als Cofaktor der Cytochrom C Reduktase für dessen Funktionalität unerlässlich.
Das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte, von NADH als Cofaktor abhängige, Peptid bindende Protein β-Amyloid (ERAB) ist schon seit längerer Zeit dafür bekannt, dass es einige der neurotoxischen Effekte der für Alzheimer typischen amyloiden Plaques vermittelt (Yan et al., 1997). He und Mitarbeiter (1998) isolierten aus menschlichem Hirngewebe ein als L-3-hydroxyacyl-Coenzym A Dehydrogenase bezeichnetes Enzym, das in seiner Aminosäuresequenz identisch mit ERAB ist.

Es müsste durch weitere Studien untersucht bzw. abgesichert werden, in wieweit NADH in der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine Rolle spielt, und ob, von dieser möglichen Beteiligung ausgehend, der Einsatz von NADH im Therapieregime von Morbus Alzheimer sinnvoll wäre.

2.2.5. Wirkung von NADH auf die Apoptoserate

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, existiert eine direkte Beziehung zwischen physiologischem Alterungsprozess und Apoptoserate. Der programmierte Zelltod stellt einen Schutzmechanismus dar, um gezielt Zellen zu entfernen, die nicht mehr gebraucht werden, bzw. die für den Organismus potentiell schädlich sind.
Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch eine hohe Apoptoserate aus (Mukherjee et al., 1997). In neoplastische Veränderungen hingegen, die durch unkontrolliertes Wachstum auffallen, ist eine komplette oder teilweise lokale Aufhebung der Apoptose zu beobachten.
In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob NADH sowie NAD^+ und Nicotinamid die Apoptose aufhalten bzw. in irgendeiner Weise beeinflussen können.
Von der Überlegung ausgehend, dass in der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten oxidativer Stress und Apoptose eine wichtige Rolle spielen, führten Klaidmann und Mitarbeiter (1996) Versuche an Mäusen durch, bei denen die protektive Wirkung von NAD^+ gegenüber Apopotose auslösender Stimuli (Tertiäres-Butylhydroperoxid: t-buOOH) untersucht werden sollte; t-buOOH wurde intrazerebroventriculär verabreicht, woraufhin charakteristische apoptotische Veränderungen (u.a. DNS Fragmentierung) beobachtet werden konnten. Fand hingegen eine Vorbehandlung mit Nicotinamid (500mg/kg, intraperitoneal) 13 Stunden vor Injektion des Toxins statt, so konnte die DNS Fragmentierung komplett unterbunden werden. Im Zuge der Apoptose kommt es zur Depletion der NAD^+ und ATP Reserven. Schädigung der DNS löst eine Aktivierung des Enzyms poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) aus, welches NAD^+ als Substrat verwendet. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen hoher NAD^+ Konzentrationen, gesteigerter PARP Aktivität und DNS Reparaturrate (Satoh et al., 1993).
Bestätigt wurden diese Beobachtungen u.a. durch Untersuchungen an Astrozytenkulturen (Ying et al., 2004). Die Aktivation von PARP führte zu einer schnellen teilweisen Depletion von NAD^+, was mit einer kompletten Hemmung der Glykolyse einherging. Kurze Zeit später starben die Zellen. Eine Zugabe von NAD^+ führte zur Wiederaufnahme der Glykolyse und zur Verhinderung der Apoptose. Die Autoren folgern aus diesen Ergebnissen, dass aktiviertes PARP zu einer schnellen Depletion des zytoplasmatischen NAD^+ Pools, nicht jedoch der mitochondrialen NAD^+ Reserven führt. Im ersten Fall ist die Zelle nicht mehr in der Lage Glukose aufzunehmen und daraus Energie zugewinnen. Da das Gehirn fast ausschliesslich Glukose als Energiequelle verwendet, ist es für diese Art Störungen ganz besonders anfällig.
Die neuroprotektive Wirkung von Nicotinamid wurde auch im Rahmen von Verhaltensversuchen gestestet (Yang et al., 2004). 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) löst bei Mäusen einen Verlust dopaminerger Neurone aus, was

sich negativ auf Lernfähigkeit und Gedächtnisleistung auswirkt. Unter gleichzeitiger Verabreichung von Nicotinamid waren die Auswirkungen von MPTP auf Lernfähigkeit und Gedächtnis weniger gravierend. Nicotinamid vermindert oxidativen Stress, steigert NAD^+ und ATP Synthese und hemmt das Enzym PARP. Nicotinamid zeigt nicht nur einen Effekt auf intakte sondern auch auf bereits angegriffene Zellen.

Es muss jedoch angemerkt werden, dass Nicotinamid nicht nur positive Auswirkungen hat.

Neben der konzentrationsabhängigen zytoprotektive Funktion (Maiese et al., 2001) wurde auch ein erhöhtes Risiko neoplastischen Wachstums beobachtet. Die Mechanismen, durch welche Nicotinamid seine Funktionen ausübt, sind noch nicht vollständig geklärt. Es scheint jedoch, dass sowohl die zytoprotektive als auch die tumoröses Wachstum fördernde Wirkung durch das Enzym PARP vermittelt werden (Hagemann et al., 2001). Bevor klinische Studien zum Einsatz von Nicotimanid unternommen werden, sollte deshalb erst vollständig geklärt werden, über welche Mechanismen Nicotinamid seine duale Rolle ausübt (Maiese et al., 2003)

1998 untersuchten Zhang und Mitarbeiter an neuronalen Zellkulturen, inwieweit NADH die Proliferation von Nervenzellen fördern kann, bzw. in welchem Ausmass NADH durch Cisplatin hervorgerufene apoptotische Veränderungen verhindern kann. Die Ergebnisse zeigten, dass eine optimale NADH Konzentration von 300-400μg/ml die Proliferationsrate der neuronalen Zellen um 28,6% steigern konnte.

Die apoptosehemmende Wirkung von NADH wurde auch in Untersuchungen an Leberzellen, die mit UV-B Licht bestrahlt wurden, bestätigt (Li et al., 2002).

NADH zeigte ausserdem einen tumorzell-spezifischen anitproliferativen Effekt bei Untersuchungen an murinen Fibrosarkom- und humanen Kehlkopfkarzinom Zelllinien (Slade, 1999). Im Vergleich zu Kontrollgruppen (Proliferationsrate = 100%) wurde unter Einfluss von NADH eine maximale antiproliferative Wirkung von bis zu 88% beobachtet. Andere Tumorzelllinien (Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Zervixkarzinom) sprachen auf NADH nicht an. Bemerkswert an diesen Resultaten war, dass NADH ausschliesslich die Proliferation von Tumorzellen aufhielt, nicht jedoch die Vermehrung gesunder Zellen.

Die Ursache dieser selektiv antiproliferativen Wirkung wird damit erklärt, dass Tumorzellen freie Radikale (v.a. H_2O_2) produzieren, die wiederum das Wachstum des Tumors fördern (Burton, 1995). NADH zeichnet sich durch eine potente anti-oxidative Wirkung aus, es kann freie Radikale neutralisieren und so deren wachstumsfördernde Wirkung auf das neoplastische Gewebe schmälern.

Es existieren zahlreiche theoretische Ansätze, um die mögliche antitumoröse und apoptosehemmende Wirkung von NADH zu erklären. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um diese Hypothesen zu prüfen.

2.2.6. Mögliche antidepressive Wirkung von NADH

Biochemische Untersuchungen, die an Proben aus Liquor zerebrospinalis und *post mortem* an Gehirnen von unter Depression leidenden Patienten durchgeführt wurden, belegen, dass bestimmte Neurotransmitter, insbesondere Noradrenalin und Serotonin sowie deren Metaboliten, im Vergleich zu Patienten, die nicht unter Depression litten, signifikant erniedrigt sind (Schildkraut 1965, Coppen1965).

Die klassische Depressionstherapie beschränkt sich einerseits auf die Gabe von Antidepressiva, die die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin hemmen, sowie andererseits auf die Verabreichung von Substanzen, welche die Neurotransmitter abbauenden Enzyme hemmen (Monoaminoxidase Hemmer). Vor allem letztere sind mit einer Reihe unerwünschter Wirkungen belastet, die häufig in der Anfangsphase der Therapie auftreten und deshalb die Compliance des Patienten negativ beeinflussen.

Wie bereits erwähnt, wird der Einsatz von NADH in der Parkinsontherapie schon lange intensiv untersucht. Da Parkinson Patienten oft gleichzeitig an Depression leiden, die unter Verabreichung von NADH meist völlig verschwand, lag die Überlegung nahe, die Wirkung von NADH an ausschließlich unter Depression leidenden Patienten genauer zu untersuchen. Birkmayer und Mitarbeiter führten 1991 eine offene nicht Placebo kontrollierte, Studie an 205 Patienten durch, wobei NADH über einen Zeitraum von 5-310 Tagen oral, intramuskulär und intravenös verabreicht wurde. Es konnte eine durchschnittliche Verbesserung der depressiven Symptomatik um 11,5% mit Maximalwerten um 44% festgestellt werden. Allerdings muss erwähnt werden, dass sich Birkmayer und Mitarbeiter bei der biochemischen Begründung, warum NADH einen positiven Effekt bei depressiven Patienten ausübt, auf Studien berufen, deren Aussagekraft in diesem Zusammenhang eher fraglich erscheint; und zwar auf eine von Vrecko und Mitarbeitern (1997) durchgeführte Untersuchung, bei der nachgewiesen wurde, dass NADH die Dopaminsynthese anregt. Da der Dopaminmangel im Krankheitsgeschehen der Depression eine nur sehr untergeordnete Rolle (Vallejo, 1991) spielt, bedarf es weiterer Klärung, ob und in welcher Form NADH in das pathogenetische Geschehen der Depression einwirkt.

Eine an unserem Institut durchgeführte tierexperimentelle Arbeit (Rex et al., 2003) bestätigt eine antidepressive Wirkung von NADH. NADH und sein Vorläufer Nicotinamid wurden im Forced Swim Test, einem vielfach zum Screening von Antidepressiva eingesetztem Test (Porsolt et al., 1977, Cryan et al., 2002), auf ihre antidepressiven Eigenschaften bei Ratten im Vergleich zu Kontrollen und herkömmlichen Antidepressiva (Desipramin und Fluoxetin) untersucht.

Der Forced Swim Test (FST) wurde 1977 von Porsolt und Mitarbeitern an Ratten entwickelt. Er basiert auf der Beobachtung, dass Ratten, die in einem mit Wasser gefüllten Zylinder

gesetzt werden, anfangs durch Fluchtbewegungen versuchen, daraus zu entkommen, nach kurzer Zeit jedoch in einen Zustand der Immobilität verfallen und nur noch die notwendigen Bewegungen durchführen, um den Kopf über Wasser zu halten. Wiederholt man diesen Versuch nach 24 Stunden, so zeigen die Tiere das gleiche Verhalten. Wird jedoch in der Zwischenzeit eine Substanz mit antidepressiver Wirkung verabreicht, so führt das Tier die anfänglichen Fluchtbewegungen über einen längeren Zeitraum durch, als wenn nur Placebo verabreicht wird.

NADH zeigte eine dem Fluoxetin ähnliche Wirkung, es führt zu einer zeitlichen Verlängerung des Schwimmverhaltens. Die minimal effektive Dosis lag bei 5mg/kg. Nicotinamid zeigte in diesem Zusammenhang keine Wirkung. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde nach Verabreichung gleicher Mengen NADH im Open field test untersucht, ob NADH eventuell zu einer Steigerung der motorischen Aktivität führt. Das war nicht der Fall.

Verschiedene Autoren (Chinnery et al., 1997, Onishi et al., 1997, Gardner et al., 2003a und 2003b) haben den Gedanken geäußert, dass pathogenetisch eine mitochondriale Dysfunktion am Krankheitsbild der Depression beteiligt sein könnte.

Gardner und Mitarbeiter (2003b) nahmen bei 28 an unter Depression leidenden Patienten Muskelbioptate und untersuchten diese auf das Vorhandensein mitochondrialer Mutationen. Die Ergebnisse zeigten, dass mitochondriale Deletionen häufiger bei den an Depression leidenden Patienten zu finden waren, als bei den gesunden Kontrollen.

2.2.7. Antihypertensiver Effekt von NADH

Hypertension und die damit verbundenen pathologischen Veränderungen sind altersbedingte Erscheinungen, unter denen ein Großteil der Bevölkerung der Industrieländer leidet. Coenzym Q_{10}, eine dem NADH ähnliche Substanz, dessen physiologische Funktion ebenfalls an die Elektronentransportkette gebunden ist, soll sowohl antihypertensive als auch antioxidative Eigenschaften besitzen (Greenburg et al., 1990). Bushehri und Mitarbeiter untersuchten 1998 an spontan hypertensiven Ratten (SHR), ob NADH ebenfalls antihypertensive Eigenschaften aufweist, bzw. ob es einen positiven Effekt auf andere kardiovaskuläre Risikofaktoren ausübt. In einer tierexperimentellen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass NADH bei Ratten nach 8 wöchiger Behandlungsdauer zu einer signifikanten Blutdrucksenkung im Vergleich zur Placebogruppe geführt hatte. Außerdem wurde in der blutchemischen Analyse festgestellt, dass der Cholesterinspiegel und die aus der Lipidperoxidation stammenden Endprodukte (die einen Hinweis auf das Ausmaß freier Radikalproduktion liefern) unter NADH Einfluss abnehmen.

Die für die antihypertensive und antioxidative Wirkung von NADH verantwortlichen Mechanismen liegen noch im spekulativen Bereich.

2.2.8. Experimenteller Einsatz der NADH Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der Tumorgröße

Ein anderes Teilgebiet, bei dem die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der lokalen NADH Fluoreszenz experimentell zum Einsatz kommt, ist die Tumordiagnostik.

Die Standardtherapie vieler Tumore ist die chirurgische Resektion. Je radikaler die Entfernung des tumorösen Gewebes, desto besser die langfristige Prognose. Andererseits ist der Erhalt gesunden Gewebes ebenfalls von grosser Bedeutung. Deshalb wäre es sinnvoll, bereits auf dem Operationstisch feststellen zu können, wo die genaue Grenze zwischen neoplastischem und gesundem Gewebe verläuft.

Da sich neoplastisches Gewebe immer durch eine höhere metabolische Aktivität als das gesunde Gewebe auszeichnet, sollte sich diese Tatsache auch in einer gewebeabhängigen variierenden NADH Autofluoreszenz widerspiegeln. In einer gesteigerten Stoffwechsellage wird grundsätzlich mehr NADH verbraucht, weshalb sich Tumorgewebe durch eine erniedrigte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu gesundem Gewebe auszeichnen sollte. Zahlreiche Forschungsarbeiten stützen diese Annahme. König führte 1995 eine Studie zum Einsatz der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie zur Früherkennung von Harnblasenkarzinomen durch.

Die *in vivo* Versuche ergaben für die Fluoreszenzintensität neoplastischer Areale tatsächlich einen niedrigeren Wert als für das gesunde Gewebe (30-70%). Hier trifft die eingangs erwähnte Überlegung zu, dass sich Tumorgewebe durch eine verstärkte metabolische Aktivität sowie eine übermäßige Gefäßversorgung auszeichnet. Ein vermehrter NADH Verbrauch, eine daraus resultierende NADH Konzentrationsabnahme, sowie ein vermindertes Fluoreszenzsignal sind die Folge davon.

2.2.9. Experimenteller Einsatz der NADH Fluoreszenzmessung zur Erkennung ischämischer Läsionen

Viszerale sowie zerebrale Ischämie, die in Assoziation mit einigen Krankheiten meist als Vorläufersymptom auftritt, und schwere klinische Folgen nach sich zieht, kann unter Zuhilfenahme der Aufzeichnung des von NADH ausgehenden Fluoreszenzsignales diagnostiziert bzw. kontrolliert werden.

Sundt und Mitarbeiter untersuchten 1975 den Zusammenhang zwischen NADH Fluoreszenz und Ischämie im Kortex des Affen , dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht: in einer avaskulären Region des Kortex wurde die NADH Fluoreszenz vor, während und nach einer

fokalen inkompletten Ischämie gemessen. Präischemisch wurde ein konstantes Fluoreszenzsignal gemessen. Während der Ischämie wurde eine Signalzunahme registriert. Nach Restauration des Blutflusses ging die Fluoreszenzintensität auf ihr vorheriges konstantes Niveau zurück. Der durch Anoxie hervorgerufene Exitus zeichnete sich durch eine alle vorhergehenden Veränderungen überschreitende Signalzunahme aus.

Die Entstehung einer zerebralen ischämischen Läsion ist vom Auftreten sogenannter vorrübergehender fokaler Depolarisationen (transient focal depolarisations: TFDs) begleitet. Untersucht wurde dieses Phänomen u. a. von Strong und Mitarbeitern (1996), die eine Methode entwickelten, um TFDs in Zusammenhang mit anderen physiologischen Parametern studieren zu können. Einer dieser Parameter ist das Redoxpaar $NADH/NAD^+$, welches als Markermolekül für TDFs genutzt werden kann. TDFs erzeugen entweder einen vermehrten Übergang von NAD^+ nach NADH und/oder eine Abnahme des lokalen Blutflusses. Beide Veränderungen resultieren in einer Zunahme der lokalen Fluoreszenz.

Sowohl nach Schädel-Hirn Trauma als auch im Verlaufe neurochirurgischer Eingriffe kommt es zu einer mehr oder weniger lebensbedrohlichen Beeinträchtigung der zerebralen Vitalitätsparameter (Sauerstoffversorgung, zerebraler Blutfluss, intramitochondrialer NADH Redoxzustand sowie des intrakranialen Druckes). Mayevsky und Mitarbeiter (2004) entwickelten in jahrelanger Arbeit ein Gewebespektroskop (Tispec), das zur Überwachung und Beurteilung der genannten Vitalitätsparameter eingesetzt werden kann. Während sich in den frühen Modellen die Bestimmung der NADH Fluoreszenz schwer gestaltete, konnte in weiterentwickelten Modellen festgestellt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen zerebralem Blutfluss und NADH Redoxstatus besteht, und dass Veränderungen des ersteren, durch Variationen des zweiteren widergespiegelt werden.

Im experimentellen Rahmen fand das Gewebespektroskop bereits mehrfach Anwendung sowohl beim Monitorig von Intensivpatienten (Mayevsky et al., 1996 und 1998) als auch bei der Durchführung verschiedener neurochirurgischer Eingriffe (Mayevsky et al., 1999 und 2002). Vitalitätsparameter wie mikrozirkulatorischer Blutfluss und mitochondriale NADH Konzentration wurden ausserdem gleichzeitig an mehreren Organen gemessen (Gehirn im Vergleich zu Niere, Leber, Hoden), um zu sehen, wie sich eine Schocksituation in den einzelnen Organen qualitativ und unter zeitlichem Aspekt manifestiert (Kraut et al., 2004).

Einige ischämische Insulte sind vorrübergehender Natur, da sich nach einiger Zeit der normale Blutfluss erneut einstellt. Dieses als Reperfusion bezeichnete Phänomen kann ebenfalls zu unphysiologischen Stoffwechselreaktionen führen und pathologische Folgen nach sich ziehen. Martin und Mitarbeiter (2004) untersuchten diese Folgen am Beispiel des Enzyms Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHC). PDHC katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Azety-CoA und CO_2, gleichzeitig entsteht durch die Reduktion von NAD^+ ein Molekül NADH. Ischämie und Reperfusion beeinträchtigen die Funktionalität der PDHC,

ausserdem kommt es während der Reperfusion zur Hyperoxidation von NADH sowie mehrerer Komponenten der Elektronentransportkette. Eine gestörte Aktivität von PDHC wurde auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen festgestellt.

Sadanaga-Akiyoshi und Mitarbeiter (2003) untersuchten die neuroprotektive Wirkung von Nicotinamid und NAD^+ an spontan hypertensiven Ratten im Verlauf ischämischer Insulte.

Nicotinamid wurde präischämisch intravenös (125mg/kg und 250mg/kg) verabreicht, anschließend wurden zerebraler Blutfluss und Infarktvolumen bestimmt. Zusätzlich wurden Nicotinamid und NAD^+ quantitativ mittels HPLC im ischämischen Zentrum und im Randgebiet gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass Nicotinamid, in einer Konzentration von 250mg/kg, eine signifikante Erhöhung des ischämischen zerebralen Blutflusses im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen verursacht. Das Infarktvolumen war um 36% kleiner als das der Kontrollen. Mittels HPLC konnte festgestellt werden, dass ischämische Prozesse per se die Konzentration von Nicotinamid und NAD^+ nicht beeinflussen. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass Nicotinamid wahrscheinlich einen neuroprotektiven Effekt gegenüber ischämischen Einflüssen ausübt.

2.3. Nachweismethoden für NADH

Bereits bei den frühen Bestimmungsmethoden von NADH wurden dessen spektroskopische Eigenschaften ausgenutzt. NADH und NAD^+ absorbieren Licht der Wellenlänge λ = 260nm. Die reduzierte Form NADH zeigt zusätzlich ein Absorptionsmaximum bei λ = 340nm. Im physiologischen Medium stellt sich zwischen NADH und NAD^+ im Ruhezustand ein Gleichgewicht ein. Auf Grund der charakteristischen spektroskopischen Signale kann dieser Prozess optisch verfolgt werden. Die spezifische Lichtabsorption der hydrierten Pyridinnukleotide kann außerdem zur Konzentrationsbestimmung von Substraten und NADH/NADPH- abhängigen Enzymen genutzt werden (Rapoport, 1975).
Zur Konzentrationsbestimmung von Pyridinnukleotiden stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

- Enzymatische Verfahren:
- HPLC
- Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie

Die enzymatischen Verfahren nutzen die Funktion der Pyridinnukleotide (NAD^+ und $NADP^+$) als Coenzym aus (Passonneau und Lowry, 1974). Die Bestimmung von NADH wird durch die Reaktions-Koppelung mit einem NADH-abhängigen Enzym erleichtert. Durch Zusatz eines entsprechenden Substrates wird das Enzym aktiviert. Da der Reaktionsablauf von einer Umwandlung des NADH in NAD^+ oder umgekehrt begleitet ist, kann durch eine nachfolgende spektroskopische Analyse der $NAD(P)H/NAD(P)^+$ Gehalt bestimmt werden (Rapoport, 1975).
Innerhalb der enzymatischen Verfahren unterscheidet man zwischen spektrophotometrischer und fluorimetrischer Bestimmung sowie dem Enzymatic Cycling.
Für die Klärung einiger Fragestellungen ist die Gesamtbestimmung von $NADH/NAD^+$ ausreichend. In anderen Fällen ist es sinnvoll, NAD(P)H vor der Extraktion erst vollständig in NAD(P) zu oxydieren. Bei den älteren Bestimmungsmethoden muss der Pyridinnukleotid-Bestimmung erst eine Extraktion aus zellulären und subzellulären Strukturen vorausgehen.
Erschwert wird die Extraktion dadurch, dass die reduzierten Pyridinnukleotide NADH und NADPH im sauren Milieu unstabil sind. Falls nötig muß eine Trennung deshalb unter Zusatz von Alkali durchgeführt werden, wobei die oxydierten Formen zerfallen (Klingenberg, 1974).

2.3.1. Enzymatische Verfahren zum Nachweis von NADH

2.3.1.1. Spektrophotometrische Bestimmung

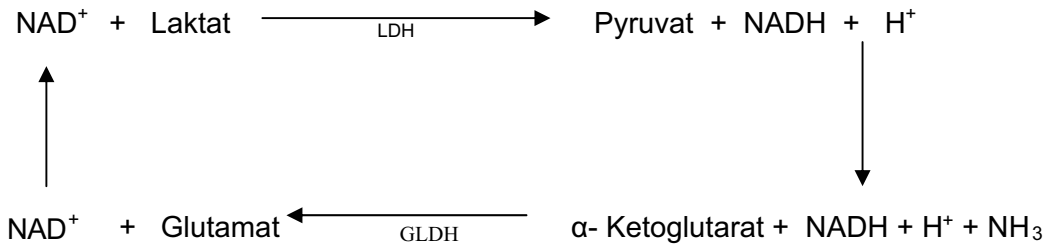
Mit Hilfe der spektrophotometrischen Absorption kann man den Gehalt an Pyridinnukleotiden mit hoher Genauigkeit bestimmen, vorausgesetzt, die vorhandene Menge unterschreitet einen Wert von 10nM nicht (Klingenberg, 1974).
Prinzipiell können alle NADH-abhängigen Dehydrogenase Reaktionen in diesem Verfahren genutzt werden; besonders häufig verwendet man jedoch die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase. Die NADH Bestimmung erfolgt im einem alkalischen, nach Neutralisation gepufferten Extrakt. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von NADH durch Dihydroxyacetonphosphat. Nach Reaktionsablauf erfolgt die spektroskopische Bestimmung von NADH bei einer Wellenlänge von λ = 340nm gegen eine Vergleichsküvette mit verdünnter Kaliumdichromat-Lösung. Rechnerisch erhält man die NADH-Menge pro Volumeneinheit des Untersuchungsmaterials (Klingenberg, 1974).

2.3.1.2. Fluorimetrische Bestimmung

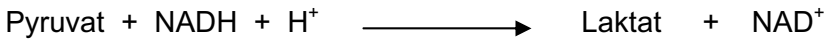
Die fluorimetrische Methode zeichnet sich durch eine höhere Empfindlichkeit als das vorhergehende Verfahren aus und ist deshalb zur Bestimmung kleinerer Mengen von NADH (bis zu 0,05 nMol) geeignet (Klingenberg, 1974).
Die reduzierten Pyridinnukleotide NADH und NADPH besitzen die Eigenschaft der Autofluoreszenz, d.h. bei Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge emittieren sie ein Fluoreszenzsignal. Im analytischen Versuchsaufbau verwendet man dazu eine Quecksilber- oder Xenonlampe, die das Anregungslicht produziert. Dieses wird vor Erreichen des Probenextraktes durch einen optischen Filter (Monochromator) geschickt, der nur Anregungslicht der Wellenänge λ = 340nm passieren lässt. Das Zusammentreffen von Anregungslicht und Probengemisch löst ein Fluoreszenzsignal aus, das vor Registrierung ebenfalls durch einen Monochromator geschickt wird, der ausschließlich für λ = 450nm durchlässig ist. Am Detektor angekommen, wird die Intensität der eintreffenden Strahlung bestimmt.
Der Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass das emittierte Fluoreszenzsignal nur in willkürlichen Einheiten abgelesen werden kann. Durch den Zusatz einer NAD-Lösung zum Extrakt muss dieser stets geeicht werden (Klingenberg, 1974).

2.3.1.3. Enzymatic cycling

Unter Einsatz des enzymatic cycling Verfahrens können selbst kleinste Menge an Pyridinnukleotiden bestimmt werden (bis zu 10^{-5} nMol) (Klingenberg, 1974). Die Nukleotide wirken in diesem Fall als Katalysatoren einer Redox-Reaktion zwischen zwei Substraten. Da die verwendeten Nukleotid Konzentrationen weit unter ihren K_M Werten liegen, ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Nukleotid Konzentration proportional. Nach einigen tausend Zyklen wird eines der Produkte (Pyruvat) gemessen. Zur NAD^+ und NADH Bestimmung werden jeweils Laktat-Dehydrogenase (LDH) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) eingesetzt:



Die dabei entstehende Pyruvat Menge ist der Pyridinnukleotid Konzentration proportional und kann fluorimetrisch gemessen werden.



Zur fluorimetrischen Bestimmung von Pyruvat werden optische Filter eingesetzt, die Anregungslicht der Wellenlänge λ = 360 und Emissionslicht der Wellenlänge λ = 460 selektieren. Zu jeder Messreihe müssen NAD- und NADH-Standardwerte mit analysiert werden (Passonneau und Lowry, 1961). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie nicht *in vivo* durchgeführt werden kann, folglich sind nur einmalige Aussagen über eine momentane NADH Konzentration möglich. Als Probenmaterial wird häufig *post mortem* isoliertes Gewebe verwendet.

2.3.2. Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Der Einsatz der HPLC zur Bestimmung von Pyridinnukleotiden ist relativ jungen Datums. Mit der von Klaidman und Mitarbeiter 1995 erarbeiteten Methode ist es möglich, die Gesamt-Pyridinnukleotid Menge (zytoplasmatische, nukleäre und mitochondriale Fraktion) zu bestimmen. Es handelt sich um ein hochsensitives Verfahren, bei dem oxidierte und reduzierte Formen gleichzeitig bestimmt werden. Die oxidierten Formen werden in basischem Milieu durch Verbindung mit Zyaniden in fluoreszierende Produkte umgewandelt. In der anschließenden chromatographischen Analyse zeigen letztere andere Retentionszeiten als die reduzierten Pyridinnukleotide.
Kritischer Punkt aller bisher genannter Bestimmungsmethoden ist die Gefahr, dass es zu einer künstlichen Umwandlung oxidierter in reduzierte Formen kommen kann.
Der Vorteil des HPLC Verfahrens besteht darin, dass aufgrund der geringen Anzahl von Zwischenschritten eine schnelle Verarbeitung stattfinden kann, wodurch es kaum zu einer Umwandlung bzw. Abbau einzelner Komponenten kommt. Als Probenmaterial genügen bereits 10mg Gewebe. Auch das HPLC Verfahren kann nicht zur in vivo Bestimmung von NADH verwendet werden. Es liefert, wie das enzymatic cycling, nur einmalige Aussagen über die momentane Konzentration von NADH in einer Probe.

2.3.3. Messung der NADH Fluoreszenz mittels Laser-induzierte Fluoreszenz - spektroskopie (LIF)

Bei der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich um eine qualitative bzw. auch semi-quantitative Methode zum Nachweis autoflouresziierender Substanzen.
Die Fluoreszenz, die ein Molekül emittiert, ist durch folgende Parameter charakterisiert:
Intensität, Fluoreszenzspektrum, Fluoreszenzlebensdauer sowie zeitliches Abklingverhalten. Während die Intensität der Fluoreszenzstrahlung von der Konzentration der zu messenden Substanz abhängig ist, handelt es sich bei den anderen Parametern um individuelle Merkmale, die es erlauben, ein fluoreszierendes Molekül eindeutig zu identifizieren. Das Fluoreszenzspektrum von NADH zeigt ein Maximum bei λ = 460nm. NADH hat eine kurzlebige Fluoreszenz von 0,4ns.
Trägt man die Fluoreszenzstrahlung (Intensität) einer wässrigen NADH Lösung in Abhängigkeit der Zeit auf, so erhält man eine charakteristische Kurve, die das Abklingverhalten der Fluoreszenzstrahlung von NADH widerspiegelt.

Vorausgesetzt, man kennt die charakteristischen Daten des zu untersuchenden Moleküls, so ist es durch den Einsatz zeitlicher und spektraler Filter möglich, selektiv Fluoreszenzsignale einer bestimmten Wellenlänge zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Aussenden des Anregungslichtes zu messen (Pfeifer et al., 1996).
Rex und Mitarbeiter (2001) führten anfangs Versuche mit breiten zeitlichen Toren durch. Unter diesen Bedingungen konnte die NADH Fluoreszenz, aufgrund hoher Hintergrundfluoreszenz durch Fremdfluorophore, jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Die Autoren ziehen deshalb für alle weiteren Versuche den Schluss, nur noch kurze Zeittore (2ns) zu verwenden.

2.3.3.1. Aufbau eines Laserfluoroskopes

Ein Laserfluorsokop besteht aus den folgenden Grundbausteinen (siehe auch Abb.6, S.50)
Als Lichtquelle fungiert ein gepulster Stickstofflaser, der kurze Lichtimpulse einer gewünschten Anregungswellenlänge aussendet. Bevor es zur Emission von Fluoreszenzlicht kommt, ist der Laserstrahl bereits abgeklungen. Dadurch existiert ein kurzes zeitliches Fenster, in dem die NADH Fluoreszenz ohne Störung durch Streustrahlung des Anregungslichtes gemessen werden kann (Fink et al., 1993).
Die Lichtimpulse werden über eine optische Glasfasersonde zum Probengewebe (Kortex) geleitet. Ein Teil der Lichtstrahlen verlässt die Sonde in senkrechter Richtung, trifft auf das Gewebe, dringt bis zu 0,5mm ein und regt auf dieser Strecke die vorhandenen NADH Moleküle zur Fluoreszenz an. Ein anderer Teil der Strahlen verlässt die Sonde schräg und trifft deshalb in einem schrägen Winkel auf das Gewebe. Diese Strahlen dringen nicht in die Probe ein, sondern werden als Streulicht reflektiert. In unserem Versuchsaufbau werden sowohl Fluoreszenz- als auch Streulicht registriert. Eine andere Lichtleitfaser, fängt die rückläufigen Strahlen ein und leitet diese in Richtung Empfängereinheit weiter. Durch Passage einer Y-förmigen Kreuzung werden Fluoreszenz- und Streulicht getrennt und anschließend separat über optische Filter geleitet. Diese dienen dazu, Fluoreszenzstrahlen bestimmter Wellenlänge zu selektieren, alle andersartigen Signale werden ausgefiltert. Die technische Einheit der optischen Filter bezeichnet man auch als Monochromator.
Nachgeschaltet befindet sich ein Photomultiplier, dessen Funktion darin besteht, das gefilterte Signal zu verstärken.
Eine weitere „Signalreinigung“ findet durch den Einsatz eines Zeittores statt. Wie bereits erwähnt, besteht dessen Aufgabe darin, durch Öffnen und Schließen der Signalleitung zu bestimmten Zeitpunkten und in einem bestimmten Rhythmus nur Signale mit gewünschten Eigenschaften passieren zu lassen. Die Einstellung des Zeittores kann an die

Aufgabenstellung angepasst werden, d.h. in unserem Fall an die Fluoreszenzlebensdauer von NADH.
Das doppelt gefilterte Signal erreicht nun die Empfängereinheit, welche die elektrischen Impulse in graphische Daten umwandelt, die auf einem Bildschirm dargestellt werden.

Vorteile dieser Methode

Die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie bietet einerseits die Möglichkeiten, die bereits ältere fluorometrische Methoden leisteten, wie Messungen *in vivo* und selektiv optische Signaldetektion durch den Einsatz zeitlicher Filter. Zusätzlich verfügt sie allerdings über mehrere entscheidende Vorteile:
Die Verwendung eines Lasers als Generator von Anregungslicht hat im Vergleich zu anderen Lichtquellen den Vorteil, dass er monochromatisches Licht produziert.
Die Wellenlänge des Anregungslichtes kann so der Aufgabenstellung angepasst werden, wodurch die selektive Anregung einer bestimmten Molekülsorte ermöglicht wird. Von NADH ist bekannt, dass es Anregungslicht der Wellenlänge 340nm absorbiert (Lakowicz, 1999), entsprechend wurde in unserem Versuchsaufbau eine Anregungswellenlänge von 337nm gewählt.
Die üblichen Methoden der Fluoreszenzdetektion sind statische Verfahren, d.h. sie liefern Information über Intensität und spektrale Verteilung des emittierten Lichtes, meistens in Form eines statischen Fluoreszenzspektrums. Über charakteristische Eigenschaften, wie z.B. das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz, können in der Regel keine Aussagen getroffen werden.
Nicht so im Falle der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie. Durch den Einsatz zeitlicher Filter wird eine selektiv zeitliche Signaldetektion ermöglicht, wodurch charakteristische Eigenschaften wie Fluoreszenzlebensdauer und zeitliches Abklingverhalten als zusätzliche Identifikationsdaten zur Verfügung stehen.
Zum Transport von Anregungs- und Emissionslicht wurden sehr feine faseroptische Sonden verwendet (Durchmesser von Kabel und Sondenspitze 100μm). Anregungslicht kurzer Wellenlänge (337nm) dringt bis zu 0,5mm in das Gewebe (Chance et al., 1962). Das eigentliche Probenvolumen beträgt 0,04μl (Rex et al., 2001), wodurch eine hohe räumliche Auflösung erzielt wird.
Zusammenfassend kann man sagen, dass sich im Rahmen der NADH Fluoreszenzbestimmung die LIF als eine adequate Nachweismethode bewährt hat, die sich sowohl durch eine hohe Spezifität als auch durch hohe zeitliche und räumliche Auflösung

charakterisiert. Unter Anwendung der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie können NADH Konzentrationen bis zu 10-9 mol bestimmt werden (Fink et al., 1993).

Nachteil der Methode

Erfolgt die Messung der NADH Fluoreszenz in vivo, so können folgende physiologische Faktoren einen Einfluss auf die Grössenordnung der Messergebnisse ausüben: Bewegung, oxymetrischer Effekt sowie hämodynamische Parameter. Inwieweit die einzelnen Grössen einen modulierenden Einfluss ausüben, hängt vom untersuchten Organ ab (Ince et al., 1992).

Im Rahmen unseres Versuchaufbaus ist vor allem der Faktor Hämodynamik in Erwägung zu ziehen.

Grundlage des hämodynamischen Effektes ist die Tatsache, dass Hämoglobin sowohl Anregungs- als auch Fluoreszenzlicht absorbiert, wobei ein Unterschied bezüglich der Absorptionsspektren von Desoxy-Hämoglobin und Oxy-Hämoglobin besteht. Ersteres absorbiert vor allem Anregungslicht (366nm), Oxy-Hämoglobin absorbiert vorzugsweise Fluoreszenzlicht (460nm) (Hashimoto et al., 2000).

Wie sich der hämodynamische Effekt konkret bemerkbar macht, wurde unter anderem von Chance und Mitarbeitern (1962) an perfundierten und nicht perfundierten Gehirnschnitten der Ratte untersucht. Die Fluoreszenzintensität war bis zu 23% stärker, wenn eine hämoglobin-freie Perfusionlösung verwendet wurde. Diese Versuche zeigten auch, dass Hämoglobin zwar einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität, nicht jedoch auf die Lage des Emissionsmaximums von NADH hat.

Verschiedene Forschungsarbeiten befassten sich mit der Frage, wie der Einfluss von Hämoglobin als Störfaktor bei der Aufzeichnung der NADH Fluoreszenz in vivo zu verhindern ist. Die Existenz einer linearen Beziehung zwischen Veränderungen der Fluoreszenz und des Streulichtes wurde von Harbig und Mitarbeitern (1976) bewiesen. Während die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Katze mittels einer spektroskopischen Methode registriert wurde, wurden einerseits sauerstoffgesättigte physiologische Kochsalzlösung und andererseits konzentrierte Erytrozytenlösung in die Arteria carotis comunis injiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass eine steigende Erytrozytenkonzentration Fluoreszenz- und Streulicht in linearer Weise absorbiert.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse von Rex und Mitarbeitern (1999), die gezielt den Einfluss vasoaktiver Substanzen auf die Veränderungen von Fluoreszenz- und Streulicht untersuchten. Das Bestehen einer linearen Beziehung zwischen beiden Messgrössen konnte sowohl unter Einfluss von Vasokonstriktoren als auch von Vasodilatatoren beobachtet werden.

Für die praktische Anwendung leiteten Harbig und Mitarbeiter aus ihren Ergebnissen folgende Kompensationsmethode ab: um den störenden Effekt einer variierenden Hämoglobin Konzentration zu umgehen, müssen Fluoreszenz- und Streulicht gleichzeitig über die gesamte Versuchsdauer registriert werden. Die „korrigierten“ Fluoreszenzwerte erhält man, wenn man die Streulichtwerte (R) von den Fluoreszenzwerten (F) subtrahiert (F-R).

In den letzten Jahren haben sich mehrere Studien mit der Frage auseinandergesetzt, ob die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie eine geeignete Methode darstellt, um metabolische Veränderungen (Variationen des zellulären Redoxzustand), anhand der NADH-Fluoreszenz festzustellen.

Rex und Mitarbeiter (1999) berichten vom Einsatz vasoaktiver und stoffwechsel-beeinflussender Substanzen: Vasodilatatoren verursachten eine Zunahme der NADH-Fluoreszenz, während die Verabreichung eines Vasokonstriktors den gegenteiligen Effekt bewirkte. Natriumzyanid, ein Atmungskettenhemmer führt zu einer vorrübergehenden Zunahme der NADH Fluoreszenz, wohingegen 2,4-Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, eine Abnahme der NADH-Fluoreszenz auslöst.

Mayevsky und Mitarbeiter (1999 und 2004) entwickelten ein Gewebefluoroskop, das neben anderen Parametern, die NADH Fluoreszenz als Ausdruck histologischer Vitalität misst. Diese Technik fand im experimentellen Rahmen bereits Einsatz bei der Überwachung von Intensivpatienten und zur Kontrolle der Gewebevitalität während neurochirurgischer Eingriffe.

Versuche mit Neurotoxinen zeigten, dass die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie Stoffwechselveränderungen *in vitro* (Riepe et al., 1996) und *in vivo* (Rex et al., 1999) zuverlässig registriert, auch irreversible Schäden der neuronalen Funktion wurden genau erfasst (Rex et al., 2001).

Im Rahmen von *in vivo* Versuchen wurden anfangs ausschließlich Studien an narkotisierten Versuchstieren durchgeführt. Technische Verbesserungen erlauben es seit einiger Zeit, ebenfalls Studien an wachen, frei beweglichen Tieren durchzuführen. Diese Möglichkeit wurde vor allem von Mottin und dessen Arbeitsgruppe (1997 und 2003) genutzt, um die beim Übergang vom Schlaf- zum Wachzustand stattfindenden metabolischen Veränderungen zu untersuchen.

Die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie kam bereits bei verschiedenen Organen (Herz, Leber, Niere, Darmtrakt, Auge, Hoden sowie Muskel, Haut) *in vivo* und *in vitro* zum Einsatz, vorrangig wurde sie jedoch zur Untersuchung von Hirnregionen eingesetzt: Hippokampus (Riepe et al., 1996, Rex et al., 2001), Kortex (Rex et al., 1999, Rex et al., 2002) und Nukleus raphe dorsalis (Mottin et al., 1997, Rex et al., 2001, Mottin et al., 2003).

Viele Bemühungen gehen auch dahin, die LIF als diagnostisches Werkzeug zu nutzen. Pathologische Erscheinungen, die zu einer permanenten Veränderungen des lokalen Stoffwechsels führen, eignen sich dazu besonders.
Als Beispiel ist hier der Einsatz von LIF in der Tumordiagnostik zu nennen. Tumorgewebe zeichnet sich stets durch eine höhere Stoffwechselrate als das umgebenden gesunde Gewebe aus. Aufgrund dessen kann die Bestimmung der NADH Fluoreszenz auch zur Abgrenzung tumorösen Gewebes gegenüber gesunden Gewebes genutzt werden (siehe auch 2.2.8, S.24).
Verschiedene Arbeitsgruppen berichten übereinstimmend von einer erwartungsgemäss niedrigeren NADH Fluoreszenz im tumorösen Gewebe im Vergleich zum gesundem Gewebe. Die Ergebnisse stammen von Rattengliomen, menschlichen Gehirntumoren (Yong et al., 1996) und Harnblasenkarzinomen (König, 1995). Ähnliche Techniken wurden auch zur Beurteilung der Gewebefunktionalität nach ischämischen Perioden eingesetzt (Strong et al., 1996, Thorniley et al., 1994)
Die Fluoreszenzsignale, die mit der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie erfasst werden, spiegeln das intrazellulär vorkommendes NADH wider (siehe S. 10).

Im Rahmen dieser Arbeit entschieden wir uns deshalb für die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der NADH Fluoreszenz, da mit dieser Methode spektrale Interferenzen durch andere, lokal vorkommende Fluorophore, weitgehend ausgeschlossen werden können.
Die Laserimpulse sollten keine Auswirkungen auf die Funktionen des Zellverbandes haben. Emittierte Laserstrahlen regen jedoch nicht nur NADH Moleküle zur Fluoreszenz an, sondern auch andere im Gewebe enthaltene endogene Fluorophore. (siehe S.9). In Untersuchungen am Kortex kommen als mögliche „Fremdfluorophore“ vor allem Flavine und NADPH in Frage, in Untersuchungen an der Darmwand außerdem Kollagen.
Flavine zeichnen sich durch eine relativ lange Fluoreszenzabklingzeit aus (siehe Tab.1, S.9), ausserdem liegt ihr Emissionmaximum in einem anderen Größenordnungsbereich als das von NADH. Durch den Einsatz sowohl optischer als auch zeitlicher Filter, die auf NADH spezifische Werte abgestimmt sind, kann man eine „Verunreinigung“ des Fluoreszenzsignales durch Riboflavine ausschließen. Trennung zwischen langlebigen (Flavine) und kurzlebigen (NADH) Fluoreszenzsignalen erreicht man durch den Einsatz eines frühen zeitlichen Fensters.

NADPH hat, wie NADH, ein Fluoreszenzmaximum bei 460nm (Lakowicz, 1999). Bei Untersuchungen am Kortex sind Fremdfluoreszenzen durch NADPH jedoch aus folgenden Gründen unwahrscheinlich:

Klaidmann und Mitarbeitern (1995) führten quantitative Untersuchungen bezüglich des NADH und NADPH Gehaltes in verschiedenen Hirnstrukturen der Maus durch. Die Ergebnisse zeigten, dass NADPH im Kortex nur in vernachlässigbar kleinen Mengen vorkommt. Versuche am Kortex der Katze unter Extrembedingungen (Anoxie und Epilepsie) bestätigen eine eindeutige Korrelation zwischen kortikalem Fluoreszenzsignal und lokaler NADH Konzentration (Jöpsis et al., 1971). Rex und Mitarbeiter (1999) führten Untersuchungen am Kortex der Ratte durch, wobei die Wirkung von Neurotoxinen (2,4 Dinitrophenol und Natrium Zyanid) auf den oxidativen Stoffwechsel an Hand der NADH Fluoreszenz untersucht wurde. Die Abhängigkeit, die dabei zwischen metabolischen Alterationen und reaktiven Fluoreszenzveränderungen beobachtet wurde, ist ebenfalls eindeutig auf NADH zurückzuführen.

2.4. Modelle zur Untersuchung der intestinalen Resorption

Es existieren verschiedene in vivo und in vitro Modelle, die zur Untersuchung der intestinalen Resorption entwickelt wurden.

Die ersten Untersuchungen wurden an wachen, nicht narkotisierten Tieren durchgeführt. Zugang zum Darm wurde durch Fisteln oder durch direkte Verabreichung der zu untersuchenden Substanz über eine gastrointestinale Sonde geschaffen (Cori, 1925).

Später wurden Resorptionsmodelle an narkotisierten Tieren entwickelt. Einzelne Darmschlingen wurden in vivo ligiert, eine bekannte Konzentration der zu untersuchenden Substanz wurde in den ligierten Darmabschnitt injiziert. Nach einer bestimmten Zeit wurde der verbliebene Darminhalt analysiert. Durch Subtraktion der verbliebenen Menge von der zu Versuchsbeginn verabreichten erhält man die absorbierte Fraktion (Verzár et al., 1936).

Als ebenso gut reproduzierbar, einfacher handhabbar und zudem kostenschonender stellten sich jedoch die in vitro Resorptionsmodelle heraus, mit denen die Vorgänge an der Darmmukosa unter Ausschluss extraintestinaler Einflüsse betrachtet werden können.

Der limitierende Faktor der in vitro Modelle ist die Sauerstoffversorgung, da der Sauerstoffbedarf des Dünndarms relativ hoch ist.

Das erste in vitro Modell wurde von Fisher und Parsons 1949 entwickelt. Das Probengewebe (Dünndarmschlinge) wird einer narkotisierten Ratte entnommen. Bevor die Blutversorgung unterbrochen wird, wird das betreffende Segment erst von zwei Seiten kanuliert und kontinuierlich mit sauerstoffgesättigter Bicarbonat Pufferlösung durchspült. Dieser Schritt soll garantieren, dass die Sauerstoffversorgung der Mukosa theoretisch zu keinem Moment unterbrochen ist. Anschließend wird das isolierte Darmsegment in einem komplizierten Versuchsaufbau in eine oxygenierte Ringer Lösung verbracht. Interne und externe Flüssigkeit werden den gesamten Versuch über mit Sauerstoff begast.

Wilson und Wiseman entwickelten 1954 das everted gut sac in vitro Modell, bei dem ein isoliertes Darmsegment so präpariert wird, dass die aktiv am Resorptionsprozess beteiligte Mukosa nach außen zeigt. Das Darmstück wird mit Tyrode Lösung gefüllt, an beiden Enden verschlossen und in eine ständig mit Carbogen begaste Tyrode Lösung gehängt (siehe Abb.5, S.45). Auf diese Weise entstehen zwei Kompartimente, die als interne und externe Flüssigkeit bezeichnet werden. Die Grenze zwischen beiden bildet die Darmwand, wobei die Mukosa in Kontakt mit der externen Flüssigkeit steht, und die Serosa die interne Flüssigkeit umgrenzt. Die zu untersuchende Substanz befindet sich zu Versuchsbeginn ausschließlich in der externen Flüssigkeit, wird im positiven Fall von der Mukosa resorbiert und akkumuliert serosaseitig in der internen Flüssigkeit. Nach Versuchsende kann die interne Flüssigkeit isoliert werden und auf den Gehalt der gewünschten Substanz untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass durch die Umstülpung des Darmsegmentes die

hochaktive Mukosafläche mit dem äußeren Medium, in dem die zu untersuchende Substanz suspendiert ist, direkt in Kontakt tritt. Durch die Flüssigkeitsfüllung des Darmsegmentes wird die aktive Oberfläche vergrößert, die für die Absorption essentiellen Mikrovilli werden gespreizt und der Darmwanddurchmesser reduziert. Außerdem können mehrere Proben gleichzeitig analysiert werden (Wilson et al., 1954). An diesem Modell kann untersucht werden, ob Substanzen von der intestinalen Mukosa resorbiert werden.
Da es sich um ein sehr einfaches Modell handelt, werden am everted gut sac bis heute orientierende Studien bezüglich der Resorbierbarkeit verschiedener Substanzen durchgeführt. Zum Beispiel wurde mit Hilfe dieses Modells die Resorption pflanzlicher Extrakte sowie phytomedizinischer Kombinationen (Kelber et al., 2001), von Hormonen, insbesondere von Testosteron und dessen Derivaten (Arellano et al., 2004) untersucht, sowie der Einsatz von Liposomen zur Verbesserung der Absorption oral verabreichter Pharmaka (Carreno-Gómez et al., 1999).
Die everted gut sac Methode ist aber auf Grund der bereits erwähnten eingeschränkten Sauerstoffversorgung in ihrer Aussagekraft auf ein qualitativ semiquantitatives Niveau, begrenzt. Quantitative Aussagen können nur als Tendenzen formuliert werden.
Auch Wilson und Wiseman waren sich des Umstandes der eingeschränkten Sauerstoffversorgung bewusst, sie konnten jedoch anhand eines einfachen Experimentes beweisen, dass die Sauerstoffversorgung der Mukosa unter den gegebenen Bedingungen ausreichend ist. Einige Versuche wurden statt bei 37°C bei 32°C durchgeführt, währenddessen wurde die Sauerstoffverbrauchsrate und die Milchsäureproduktionsrate gemessen. Die Sauerstoffverbrauchs- und Laktatproduktionsrate der Versuchen bei 37°C unterschieden sich nicht von den bei 32°C durchgeführten Versuchen. Im Falle einer ungenügenden Sauerstoffversorgung hätte man in den Versuchen bei 37°C eine höhere Laktatproduktion als in den Versuchen bei 32°C beobachten müssen.
Histologische Untersuchungen zeigten, dass beim everted gut sac Modell nach ca. 20 Minuten bereits degenerative Veränderungen auftreten, die sich nach 1 Stunde so verstärken, dass man die Versuchsdauer auf 20 –30 Minuten limitieren sollte (Plumb et al., 1987). Bei der Durchführung unserer Versuche richteten wir uns deshalb nach diesen Angaben, und legten eine Versuchsdauer von 30 Minuten fest.

Da, soweit uns bekannt, bisher keine Untersuchungen zur intestinalen Resorbierbarkeit von NADH vorliegen, beabsichtigten wir im ersten Teil dieser Arbeit eine diesbezüglich qualitative sowie tendenziell quantitative Aussage zu gewinnen, wozu das everted gut sac Modell eine geeignete, unkomplizierte Methode darstellt. Um die Resorptionsquote von NADH besser einschätzen zu können, bietet sich der Vergleich mit Substanzen bekannter Resorbierbarkeit an. Dazu wählten wir einerseits Diazepam, ein Benzodiazepinabkömmling,

das, wie fast alle Vertreter dieser Gruppe, praktisch komplett intestinal resorbiert wird (Rall, 1991). Als vergleichsweise schlecht resorbierbare Substanz wählten wir g-Strophantin (Ouabain), das als polares Herzglykosid nur in geringem Maße intestinal aufgenommen wird (Forth et al., 1969, Lüllmann et al., 1996).

Den bisher genannten Methoden ist der Nachteil der unphysiologischen Gleichgewichtseinstellung zwischen substrathaltiger mukosaler und serosaler Seite gemein.

Rummel und Stupp (1960) sowie Richter und Strugala (1985) modifizierten das Modell von Fisher und Parsons dahingehend, dass das isolierte Darmsegment in eine mit Wasserdampf gesättigte Kammer gehängt wurde, an beiden Enden mit einem zirkulären Kanalsystem verbunden wurde, in dem ein carbogen-gesättigtes Perfusionsmedium rezirkulierte. Im Unterschied zum Modell von Fisher und Parsons, bei dem die resorbierten Stoffe mit dem serosalen Puffer vermischt werden, erscheint hier ausschließlich das Resorbat auf der Serosaseite, das langsam abtropft und in einem Reagenzglas aufgefangen werden kann.

Im Sinne einer maximalen Übereinstimmung mit den physiologischen Gegebenheiten wurde aufwendige in vivo Modelle mit erhaltenem Blutfluß (Windmueller und Spaeth, 1981) und arterieller Infusionstechnik (Fisher und Gardner, 1974) entwickelt, die jedoch vor allem auf Grund ihrer komplizierten Handhabung wenig Anwendung fanden.

Intestinale Transportvorgänge können ausserdem auf zellulärer Ebene mit Hilfe frisch isolierter Darmzellen (Klee et al., 1990) oder kultivierten Darmepithelzelllinien (De Angelis et al.,1994), sowie auf subzellulärer Ebene unter Anwendung von Bürstensaumvesikeln (Langguth et al., 1993) untersucht werden.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Tiermaterial

Die Versuche wurden an insgesamt 149 männlichen Ratten des Stammes Wistar: Schönwalde durchgeführt. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 350±50g. Alle verwendeten Tiere stammten aus der Tierzucht Schönwalde GmbH, Haupstrasse 62, 16352 Schönwalde. Jedes Tier hatte mindestens eine Adaptationszeit im Tierstall des Institutes von 4 Wochen.
Gruppen von jeweils fünf Tieren wurden zusammen in Makrolon-Standard-Käfigen T4 (40cm x 60cm x 25cm) auf Altromin Weichholzfaser Einstreu gehalten. Die Käfige befanden sich in einem Raum, in dem konstante Umgebungsbedingungen garantiert waren: Temperatur von 22±2°C, relative Luftfeuchtigkeit von 55±10%, Luftumwälzung von 10-mal/Stunde, sowie Hell-Dunkel-Regime von jeweils 12 Stunden (06:00/18:00).
Leitungswasser und Futter (Altromin 1326) standen *ad libitum* zur Verfügung. Keines der verwendeten Tiere war mit anderen Medikamente vorbehandelt. Die Tötung der Tiere erfolgte, je nach Versuch, durch Isofluoran Narkose und anschließende zervikale Dislokation (Versuche *in vitro*), bzw. durch intraperitoneale Verabreichung einer Überdosis Chloralhydrat (Versuche *in vivo*).

3.1.2. Verwendete Substanzen

Substanz	Charge	Hersteller/Vertreiber
Diazepam Injektionslösung	C 27194	Ratiopharm GmbH, Ulm-D
g-Strophantin (Ouabain)	Lot 120K1101	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim-D
ENADAlert (NADH) 10mg Sublingual Tbl.	MC 34601	Labor Birkmayer GmbH, Wien-Austria
β-NADH	Lot 281201	GERBU Biotechnik GmbH, Gailberg-D
β-NAD^+	Lot 69H7008	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim-D
Kochsalz-Lösung 0,9% Braun		Braun Melsungen AG

Tabelle 2: Angaben zu den benutzten Substanzen

Genehmigungen

Alle gesetzlich vorgeschriebenen Anträge und Anzeigen zur Durchführung der Prüfung wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, Fachgruppe Veterinärwesen, Lebensmittelwesen und Gentechnik bewilligt.

3.1.3. Versuche zur intestinalen Resorption von NADH *in vitro*

3.1.3.1. Vorbereitung der verwendeten Substanzen

Als Lösungsmittel wurde in allen Fällen dieses Versuchsabschnittes eine Tyrodelösung nach Kolb (1974) verwendet. Zusammensetzung in %: NaCl = 0,8. KCl = 0,02. $CaCl_2$ = 0,02. $NaHCO_3$ = 0,1. NaH_2PO_4 = 0,005. $MgCl_2$ = 0,01 und Aqua bidest. Nicht aufgebrauchte Tyrode Stammlösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag wieder verwendet.

Die zu untersuchenden Substanzen, bzw. Zubereitungen (Diazepam, g-Strophantin, NADH sowie $NAD^{+)}$) wurden in Tyrode gelöst (siehe Tab.3 unten).
Die NADH Konzentration entsprach den Dosierungen die bei Ratten im Verhaltensversuch Wirkung gezeigt haben (Rex et al., 2004a, Rex et al., 2004b).

In Voruntersuchungen wurde die Stabilität der selbst hergestellten NADH (10mg/l und 100mg/l) Lösung mittels HPLC untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass die NADH Lösung sowohl bei unterschiedlichen Temperaturen (-85°C, -20°C und 5-8°C) als auch bei verschiedenen pH Werten (7,0 und 8,5) über einen Zeitraum von mindestens einer Woche stabil bleibt.
Aus dieser Beobachtung wird der Schluss gezogen, dass die NADH Lösung sowohl über den Zeitraum des Versuches als auch von einem Tag auf den anderen stabil bleibt, vorausgesetzt sie wird bei den genannten Temperaturen aufbewahrt (Kühlschrank: 5-8°C).

3.1.3.2. Versuchsplan

Substanz	Konzentration	Inkubationszeit	Anzahl der Versuche
Diazepam	1mg/l	30 min	10
g-Strophantin	1mg/l	30 min	10
NADH	10mg/l	30 min	10
	50mg/l	30 min	10
	100mg/l	30 min	10

Tabelle 3: Versuchsplan zur Untersuchung der enteralen Resorbierbarkeit von NADH *in vitro* am everted gut sac Modell.

3.1.3.3. Vorbereitung der Apparatur

Die Versuche wurden in einem temperierbaren Wasserbad (Typ M12, Firma Lauda, Lauda Königshofen, Deutschland) bei einer konstanten Temperatur von 38,5°C durchgeführt. Das Becken war mit Leitungswasser gefüllt.
Vor Versuchsbeginn wurden die für einen Versuchstag benötigten externen Inkubationslösungen (100ml) abgemessen. Als Probengefässe verwendeten wir Erlenmeyerkolben (250ml). Die als erstes zum Einsatz kommenden Probengefäße wurden mit Inkubationslösung ca. 15 Minuten vor Versuchsbeginn in das Wasserbad gestellt, um eine Versuchstemperatur von 38,5°C zu erzielen. Vor Beginn eines jeden Versuches wurde die Temperatur der Inkubationslösung erneut geprüft. Die später verwendeten Probengefäße wurden im Kühlschrank zwischengelagert.
Über eine Glaspipette, die durch einen Plastikschlauch mit einer Carbogenflasche verbunden war, wurde jedes Probengefäß bereits in der Aufwärmphase, sowie den gesamten Versuch über, separat mit Carbogen (95% O_2 mit 5% CO_2) begast.

3.1.3.4. Vorbereitung der Gewebeprobe

Zur Untersuchung der Resorptionsquoten von Diazepam, g-Strophantin und NADH verwendeten wir das von Wilson und Wiseman entwickelte *in vitro* Modell des everted gut sac.
Die Ratten wurden durch Inhalation von Isofluoran (Baxter GmbH, D-Unterschließheim) in Narkose gelegt und durch zervikale Dislokation getötet.
Das Tier wurde in Rückenlage gebracht, die Bauchdecke entlang des Rippenbogens und beidseits nach kaudal bis zur Inguinalregion eröffnet. Der Dünndarm wurde magenseitig abgeklemmt, bis zum Caecum freigelegt, komplett entfernt und augenblicklich in eine mit Carbogen begaste auf 38,5°C temperierte Tyrodelösung verbracht.
Anschließend wurde ein circa 15cm langes Darmstück vom Restdarm durch Scherenschnitt getrennt und wiederholt mit 38,5°C warmer Tyrodelösung gespült.
Während der Durchführung der folgenden Schritte befand sich das Darmsegment in einer mit Tyrodelösung (38,5°C) gefüllten Petrischale.
Ein Ende des isolierten Darmstückes wurde so geschnitten, dass es schräg ausläuft. Am apikalen Punkt wurde eine Ligatur mit langen überstehenden Fäden befestigt. Vom

gegenüberlegenden Ende aus wurde ein weicher Plastikschlauch (Durchmesser 1,5mm, Länge 16cm) eingeführt und mit einem der überstehenden Fäden verknotet. Durch vorsichtiges Zurückziehen des Schlauches konnte der Darm auf diese Weise umgestülpt werden. Ein Ende des Darmsegmentes wurde nun durch Ligatur fest, das andere Ende nur leicht verschlossen, so dass ein Verlängerungsschlauch, der von einer Tyrode gefüllten Spritze ausging, in das Darmsegment eingeführt werden konnte. Das grosse Darmstück wurde durch mehrere lockere Ligaturen, die jeweils im Abstand von 3-4cm gesetzt wurden, in mehrere kleine Darmpräparate geteilt. Durch Injektion der Tyrode füllte sich das grosse Darmstück. Die Ligaturen wurden fest zugezogen, wodurch sich die kleineren Darmpräparate abzeichneten. Der Schlauch, mit dem der Darmsack gefüllt wurde, wurde entfernt, und das betreffende Ende gleichzeitig fest zugezogen. Die einzelnen Darmpräparate wurden von einander getrennt und kamen sofort (ohne Zwischenlagerung) im Versuch zum Einsatz.

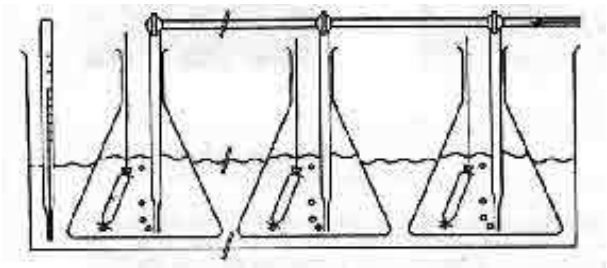


Abb: 5: Versuchsaufbau zur Messung der Resorptionsquote von Diazepam, g-Strophantin und NADH *in vitro* am everted gut sac Modell.

3.1.3.5. Versuchsdurchführung

Zu Versuchsbeginn wurde jedes Darmpräparat in einen Erlenmeyerkolben verbracht. Als Inkubationslösung diente, je nach Versuch, die in Abschnitt 3.1.3.2. beschriebenen Diazepam-, g-Strophantin und NADH Lösungen. Zu jeder Inkubationslösung wurden 10 Versuche durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 30 Minuten. Es wurden jeweils drei Darmpräparate gleichzeitig untersucht. Alle Versuche wurden bei einem pH Wert von 7,4 durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Darmstück aus der Inkubationslösung entfernt und über einem Gefäß aufgeschnitten, die luminale Flüssigkeit wurde dabei aufgefangen.

Zur Analyse der Resorbierbarkeit der zu untersuchenden Substanzen wurde mit einer Pipette jeweils 1ml folgender Proben entnommen:

A = zu Beginn des Versuches aus der externen Inkubationslösung.

B = bei Versuchsende aus der externen Inkubationslösung.

C = bei Versuchsende aus der luminalen Flüssigkeit (Resorbat), also der aus dem Darmpräparat isolierten Flüssigkeit.

Mit der Probengruppe B beabsichtigten wir festzustellen, ob sich die Konzentration der zu untersuchenden Substanz in der Inkubationslösung im Verlauf der 30 minütigen Versuchsdauer ändert. Da sich in der späteren Analyse zeigte, dass die Werte der Gruppe A und B praktisch identisch waren, gingen wir davon aus, dass in der externen Lösung im Laufe des Versuches keine Konzentrationsveränderungen stattfanden. Im Folgenden werden deshalb nur noch zwei Werte dargestellt, die der externen Lösung (B) und die der luminalen Flüssigkeit (C). Mit den vorhandenen Daten wurde die Resorptionsquote = Konzentration innen (C) / Konzentration aussen (B) x 100 berechnet.

3.1.3.6. Analytik: Messung der Konzentration von Diazepam, g-Strophantin und NADH mittels HPLC

Die Proben aus externer Inkubationslösung und luminaler Flüssigkeit wurden mittels HPLC quantitativ und auf das Vorhandensein der entsprechenden Substanz analysiert. Die HPLC Analyse fand direkt im Anschluss an die Probengewinnung aus den *in vitro* Versuche statt.

Diazepam

Die Bestimmung von Diazepam wurde in Anlehnung an die Methode von Azzam und Mitarbeiter (1998) durchgeführt.

Die Probe wurde nach Entnahme zentrifugiert und mit Hilfe eines Spezialfilters (Nylon, Porengröße 0,2μm) filtriert, bevor sie in das Injektionsventil (RH 8125, Fa. Rheodyne, USA) der HPLC eingespritzt wurde (Injektionsvolumen 20μl). Die Trennung erfolgte auf einer Intersil ODS-3-Säule (VDS Optilab, Deutschland): Partikelgröße 5μm, 2mm Durchmesser und 200mm Länge, mit einer Vorsäule von 10mm Länge und 2mm Durchmesser bei einer Fließgeschwindigkeit von 250μl/min. Die mobile Phase bestand aus 20mM Natriumphosphat, Acetonitril und 2-Propanol (Volumenverhältnis: 680/170/150ml), (pH=4,6). Die chromatographische Trennung fand bei einer Temperatur von 40°C statt. Zur Entfernung von gelösten Gasen im Elutionsmittel wurde ein 4-Kanal Degaser (Knauer, Deutschland) eingesetzt. Das Laufmittel wurde mit einer Pumpe (Modell 480, Fa. Gynkotek) gefördert. Zur

Detektion von Diazepam wurde ein UV-Detektor (Knauer, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 232 nm verwendet.
Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte unter Anwendung eines chromatographischen Datensystems (Chromatographiedatensystem CSW – Data Apex, Tschechien). Die Konzentrationsbestimmung von Diazepam in der Perfusaten wurde anhand einer vorher erstellten Eichkurve berechnet.

g-Strophantin

Probenvorbereitung, HPLC System und stationäre Phase waren identisch mit den für Diazepam beschriebenen Verfahren.
Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Wasser und Azetonitril im Verhältnis 85 zu 15 verwendet. Das Elutionsmittel wurde zuvor gefiltert (Porengröße 42μ) und entgast (10 Minuten im Ultraschallbad). Die Fließgeschwindigkeit betrug 250μl/min. Der Trennvorgang fand bei einer Temperatur von 37°C statt. Die Signaldetektion wurde bei einer Wellenlänge von 220nm vorgenommen.
Die Konzentration von g-Strophantin in den Perfusaten wurde anhand einer vorher erstellten Eichkurve berechnet.

NADH

Die Vorbereitung der Probenlösung erfolgte wie für Diazepam bereits beschrieben. Das Probengemisch wurde durch ein Injektionsventil vom Typ A 0634 (Knauer, Deutschland) in das HPLC-System eingespritzt. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus 4mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, 94% 1M Ammoniumazetat und 6% Methanol (pH = 5,6-6,3), das zuvor gefiltert (Porengröße: 42μ) und entgast (10 Minuten Ultraschallbad) wurde. Die Trennung erfolgte auf einer Spherisorb ODS II Säule (VDS Optilab, Deutschland): Partikelgröße 5μm, Länge 125mm, Durchmesser 4,6mm, bei Raumtemperatur (22°C). Zur Förderung des Elutionsmittels wurde eine Pumpe Typ 64 (Knauer, Deutschland) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1ml/Minute. Zur Signaldetektion wurde ein Fluoreszenzdetektor Typ RF 551 (Schimadzu), (Extinktion: 340nm, Emission: 465nm) verwendet.

Die Konzentration von NADH in den Perfusaten wurde anhand einer vorher erstellten Eichkurve berechnet.

3.1.3.7. Versuchsauswertung und Statistik

Für jede Substanz wurde eine Eichkurve erstellt. Vor jedem Versuch wurde eine Einpunkteichung durchgeführt.
Jede Probe wurde durch zwei Messwerte charakterisiert. Einerseits aus dem Messwert der externen Flüssigkeit (Inkubationslösung). Sowie andererseits aus dem Messwert der internen Lösung (Flüssigkeit, die aus dem Darmpräparat isoliert wurde) zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Als Referenzpunkt dienten die Werte der externen Lösung.
Die zu Versuchsbeginn in die externe Lösung verabreichte Substanzmenge ist die maximal mögliche Konzentration, die resorbiert werden kann, deshalb wurde dieser Wert als 100% Marke angesehen.
Die Resorptionsquote (R) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$R = (\text{Konzentration innen} / \text{Konzentration außen}) \times 100$$

Der Quotient von innerer und äußerer Konzentration stellt die Resorptionsquote nach 30 Minuten dar.
Die Nullhypothese „ es liegt eine Normalverteilung vor“ wurde abgelehnt. Da man in diesem Fall davon ausgehen kann, dass die Verhältnisse nicht symmetrisch verteilt sind, wurden die Werte als Median und 25./75. Perzentille dargestellt.
Beim Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der Rangvarianz-Analyse nach Kruskal Wallis und dem Dunn’s Test.

3.1.4. Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte nach sublingualer Verabreichung verschiedener NADH und NAD^+ Konzentrationen.

NADH wird bereits vermarktet und in klinischen Studien eingesetzt. Voraussetzung für die propagierte Wirkung ist jedoch, dass NADH ins ZNS gelangt. Eine oral verabreichte Substanz muss zwei Barrieren überwinden, bevor sie ins zentrale Kompartiment gelangt, erstens die Darmwand und zweitens die Blut-Hirn-Schranke. Da NADH bereits in klinischen Studien eingesetzt wird, jedoch kaum Information zur Pharmakokinetik desselben zu finden ist, untersuchten wir, ob die systemische Gabe von NADH einen Einfluss auf die NADH Fluoreszenz im Kortex hat.

3.1.4.1. Vorbereitung der verwendeten Substanzen

In diesem Abschnitt wurden drei verschiedene NADH- und drei verschiedene NAD^+ Dosen untersucht. Für den Dosisbereich NADH 10mg/kg verwendeten wir die über das Birkmayer-Labor bezogenen „ENADAlert® 10mg sublingual“ Tabletten. Dem Gewicht des Versuchstieres entsprechend wurde eine Teilmenge der Tablette zerkleinert und sublingual verabreicht.
Für die Dosisbereiche NADH 50 und 100mg/kg stellten wir eine entsprechend konzentrierte NADH Lösung für jeden Versuch frisch her. Die benötigte Menge NADH Reinsubstanz wurde abgewogen und in 0,1ml Natrium Chlorid Lösung suspendiert. Nach dem gleichen Prinzip wurde die jeweils benötigte NAD^+ Lösung hergestellt.

3.1.4.2. Messapparatur

Zur Messung der NADH Fluoreszenz verwendeten wir einen Laserfluoroskop vom Typ LF 402 Metabolic der Firma IOM Berlin, Deutschland.
Als Lichtquelle diente ein gepulster Stickstofflaser, der kurze Lichtimpulse (2,5ns) einer Anregungswellenlänge von 337nm (UV-Licht Bereich) in einer Pulsfrequenz von 10Hz produziert. Eine Glasfaser mit einer Durchmesser von 100μm und einer Länge von 3m leitete die Laserimpulse vom Generator zum Probengewebe (Kortex). Die Glasfaser besteht aus einer Quarz-Lichtleitfaser, die von einem Schutzmantel umhüllt ist. Objektseitig endet die Glaserfaser in einer Messsonde, die in eine Edelstahlkanüle gefasst ist (Produktinformation der Firma IOM).

Die Impulsenergie des Laserstrahls im Gerät betragt 100μJ, am Sondenausgang dagegen nur noch 1μJ.

Fluoreszenz und Streulicht werden über eine Glasfasersonde (Durchmesser: 100μm, Länge: 3m) , die parallel zur anregungslichtführenden Lichtleitfaser läuft, vom Probengewebe zurück zur Messeinheit geleitet. Da die exzitations- und die emissionslichtführende Faser parallel in der gleichen Hülle laufen, bezeichnet man diese Art der Sonde als Zweikanalsonde. Nach Passage einer Y-förmigen Kreuzung werden Fluoreszenz- und Streulicht getrennt. Anschließend werden die Signale separat über einen optischen Filter geleitet. Im Fluoreszenzkanal werden nur Signale der Wellenlänge 456±5nm selektiert, der Filter des Streulichtes lässt nur Signale der Wellenlänge 337±5nm passieren. Ein Photomultiplier (Hamamatsu H5 783, Herrsching, Deutschland) verstärkt die gefilterten Signale.

Anschließend erfolgt mit Hilfe eines Zeittores (Dauer der Öffnung: 2ns) eine erneute „Signalreinigung." Das doppelt gefilterte Signal erreicht dann die Empfängereinheit, welche die elektrischen Signale in graphische Daten umwandelt. Auf einem Bildschirm wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

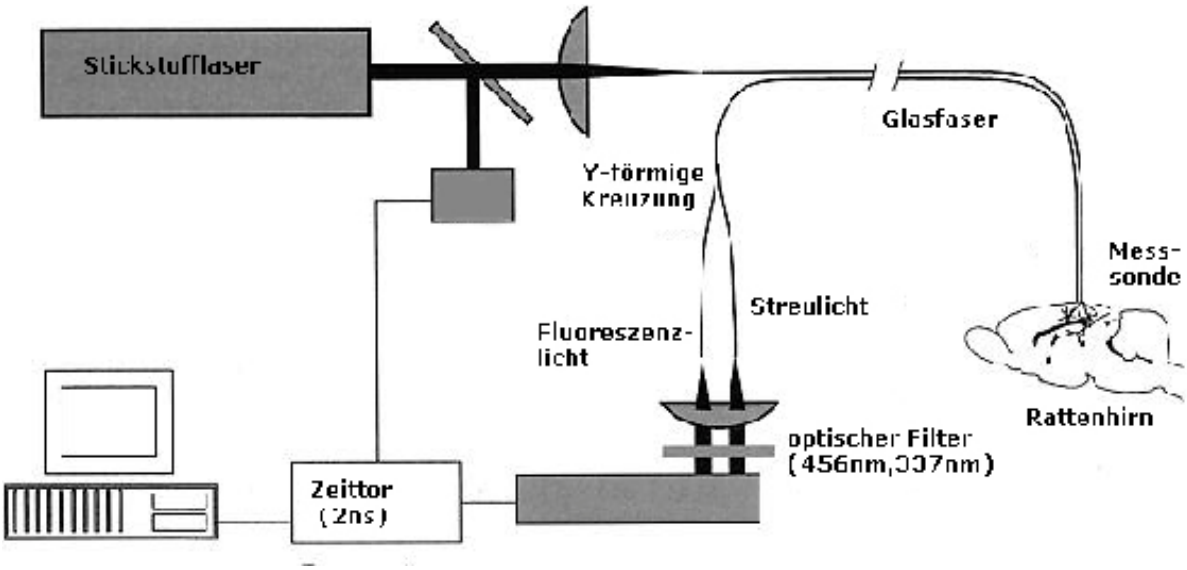


Abb.6: Schematischer Aufbau eines Laserfluorosopes

3.1.4.3. Vorbereitung und Wartung des Gerätes

Vor und nach jedem Versuch wurde die Spitze der Messsonde mit einer Lösung aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1:1 gereinigt. Die Sondenspitze ist der Teil des Stoffwechsel-Detektors, der mit dem Gewebe in Kontakt tritt. Schon minimale Verunreinigungen können zu Messfehlern führen, Blutreste an der Sondenspitze beispielsweise unterbinden den Messvorgang komplett.

3.1.4.4. Versuchsvorbereitung

Zur Durchführung der *in vivo* Versuche benötigten wir eine Narkose, die mindestens 3h aufrecht erhalten werden konnte. Wir entschieden uns für eine Kombination aus Chloralhydrat, Atropin und Ketamin. Chloralhydrat (Chloral Hydrate CIV, SIGMA-Aldrich Chemie, D-Steinheim) wurde in einer Dosis von 375mg/kg intraperitoneal verabreicht. Gleichzeitig wurde Atropin (Atropinsulfat B. Braun, D-Melsungen) in einer Dosierung von 0,05mg/kg subkutan injiziert. Bei Ratten besteht während der Narkose ein erhöhtes Asphyxie Risiko, da bronchiales Sekret und Speichel die Luftwege leicht verstopfen können. Atropin mindert dieses Risiko aufgrund seines anticholinergen Effektes. Nach etwa 10-15 Minuten wurde Ketamin (Ketavet Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen) in einer Initialdosis von 100mg/kg ebenfalls intraperitoneal verabreicht.

Chloralhydrat hat im Vergleich zu anderen Narkotika eine Wirkdauer von mehreren Stunden. Es kann jedoch die Atmung empfindlich beeinträchtigen, da es das Atemzentrum hemmt. Verminderte Kontraktilität des Myokards und Bradykardie werden ebenfalls beobachtet (Skarda et al., 1997).
Zum Ausschalten des Schmerzempfindens und um eine Dosisreduktion des Narkotikums zu erreichen, wurde zusätzlich Ketamin verabreicht. Ketamin bewirkt eine nach wenigen Minuten eintretende Analgesie, es verfügt über keine nennenswerte atemdepressive Wirkung, sondern wirkt im Gegenteil eher stimulierend auf Herz- und Kreislaufsystem. Ketamin kann beliebig oft nachdosiert werden; man verabreicht dann ½ bis $^{1}/_{3}$ der Initialdosis. Zum Abschätzen der Narkosetiefe wurden während des Versuches in regelmäßigen Abständen die Atemfrequenz, der Kornealreflex und der Zwischenzehenreflex kontrolliert, davon abhängig, jedoch maximal nach 90 Minuten, wurde Ketamin nachdosiert.

Nach Erreichen einer geeigneten Narkosetiefe wurde der Kopf des Tieres in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf, USA) fixiert. Um einer Unterkühlung und einer daraus

resultierenden Veränderung der Stoffwechsellage vorzubeugen, wurde die Ratte auf eine Wärmematte (37°C) (CMA Temperature Controller Carnegie Medicine, Schweden) gelagert.
Die Kalotte wurde zur Darstellung des Operationsfeldes auf einer Fläche von ca. 1,5x 2cm stumpf und spitz präpariert. Dann erfolgte mittels eines Handbohrers die senkrechte Trepanation der Schädeldecke. Das Bohrloch wurde ca. 5mm kaudal des Bregmas und 2mm lateral der Mittellinie gesetzt (Zielstruktur: visuelle Kortex). Im Idealfall sollte der Knochen nur bis zur Dura mater angebohrt werden, letztere wurde dann mit einer spitzen Pinzette entfernt. Die darunter liegende gefäßführende Pia mater sollte an einer Stelle durchtrennt werden, an der wenige oder keine Gefäße makroskopisch sichtbar sind. Trotz Vorsicht konnte eine Gefäßverletzung nicht immer ausgeschlossen werden, im letzteren Fall musste vor Fortführung des Versuches erst eine komplette Blutstillung abgewartet werden.
Im Anschluß daran wurden die Sonde und die vorher gereinigte Sondenspitze in den stereotaktischen Rahmen eingespannt. Die Sondenspitze wurde soweit in das vorgefertigte Loch der Schädeldecke eingelassen, bis ein konstantes NADH Signal gemessen wurde (entspricht einer Tiefe von maximal 1mm, von der Hirnoberfläche aus betrachtet).

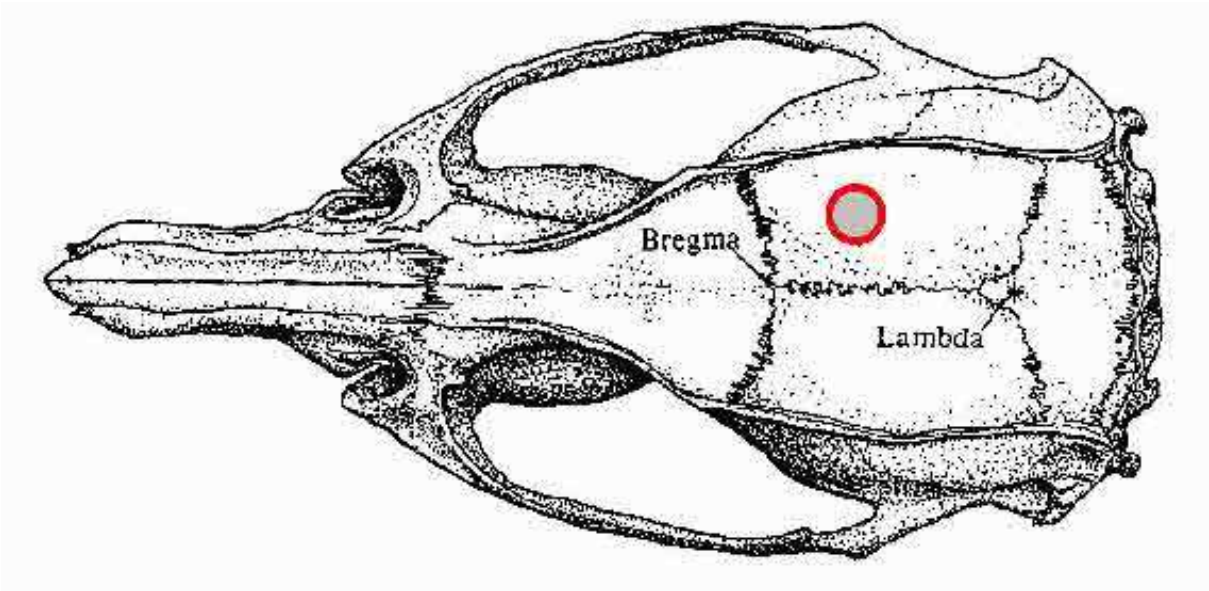


Abb. 7: Abbildung eines Rattenschädel, mit eingezeichneter Zielstruktur (**O**), an der die Messungen vorgenommen wurden.

Bei der Wahl der Sondenlokalisation muss darauf geachtet werden, dass sich keine größeren Gefäße in unmittelbarere Nähe der Messsonde befinden, da Hämoglobin sowohl Anregungs-als auch Emissionslicht absorbiert, und somit die Intensität des Fluoreszenzsignals beeinflussen könnte.

Um einer Austrocknung des Gewebes vorzubeugen, was sich negativ auf die optischen Eigenschaften der zu messenden Region auswirken würde, wurde das Trepanationsloch mit

einem in isotoner Kochsalzlösung getränkten Tupfer bedeckt, der in regelmäßigen Abständen nachbefeuchtet wurde.
Um sicher zu stellen, dass es sich bei der gemessenen Fluoreszenz um ein intrazelluläres NADH Signal im Kortex und nicht um ein extrazelluläres Signal auf der Kortexoberfläche handelt, wurde das Trepanationsloch mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Befindet sich die Sonde korrekt positioniert im Kortex, so hat die Spülung keinen Einfluss auf die gemessene Fluoreszenz, das Signal bleibt folglich konstant. Misst die Sonde jedoch nur auf der Kortexoberfläche, so würde die signalauslösende NADH Menge durch die Spülung weggeschwemmt. Ausserdem würde die Spülflüssigkeit den Raum vor der Sonde einnehmen und dessen optischen Eigenschaften beeinflussen. Eine sprunghafte Veränderung von Fluoreszenz und Streulicht wäre der Beweis dafür.

3.1.4.5. Versuchsdurchführung

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir zur Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte die von Beuthan et al., 1990, Fink et al., 1993 und Rex et al., 1999 validierte Methode der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie.
NADH ist ein ubiquitärer Bestandteil jeder Zelle, demzufolge wird man im Falle einer NADH Fluoreszenzmessung *in vivo* immer ein Fluoreszenzsignal detektieren. Die Frage ist allerdings, ob infolge einer externen Verabreichung von NADH eine Zunahme dieses Signals zu beobachten ist.
Voraussetzung ist die Aufzeichnung der NADH Fluoreszenz *in vivo* unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Zugabe von Substanzen, welche die NADH Fluoreszenz beeinflussen könnten. Zu diesem Zweck führten wir Kontrollversuche durch, bei denen, ohne Zugabe von Substanzen, ausschließlich die basale NADH Fluoreszenz und Streulicht im Kortex über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen wurde.
Die chirurgische Versuchsvorbereitung verursacht eine vorrübergehende Traumatisierung des Hirngewebes, was sich in einer schwankenden NADH Konzentration bzw. Fluoreszenzsignal bemerkbar macht. Die Fluoreszenzmessung beginnt in dem Moment beginnt, in dem die Lasersonde mit dem Hirngewebe in Kontakt tritt. Aufgrund der genannten Schwankungen des Fluoreszenzsignals wurden alle Versuche erst nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignales begonnen (etwa 30 Minuten nach Implantation der Lasersonde). Als Versuchsbeginn gilt deshalb der Zeitpunkt an dem NADH sublingual verabreicht wurde (30 Minuten nach Implantation der Lasersonde). Zur Auswertung und zur

graphischen Darstellung werden die Messwerte vom Zeitpunkt der NADH Gabe bis zu Versuchsende (0-120) verwendet.

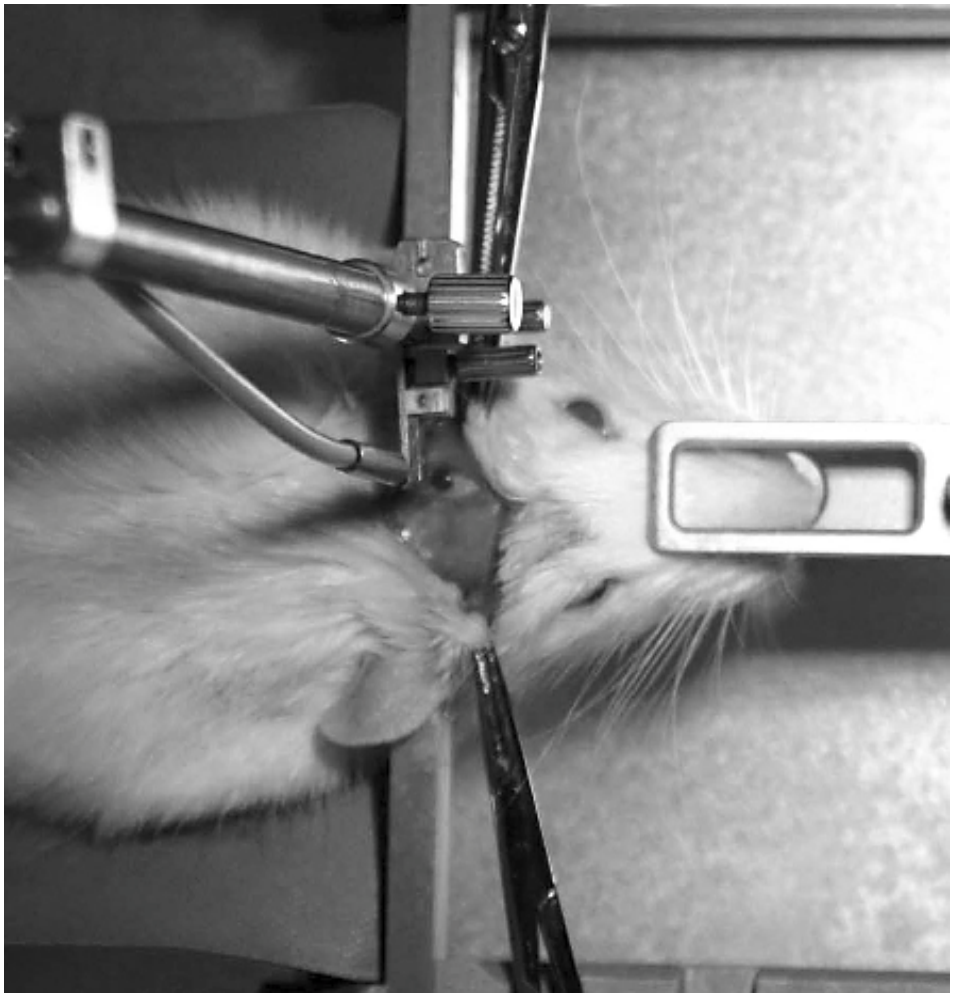


Abb. 8: Fotographie des Versuchsaufbaus. Die Abbildung zeigt, wie der Rattenkopf im stereotaktischen Rahmen fixiert wird.

Die kortikale NADH Fluoreszenz der narkotisierten Ratte wurde nach sublingualer Gabe von NADH 100mg/kg über einen Zeitraum von 240 Minuten registriert. Da sich wiederholt beobachten ließ, dass bereits nach der Hälfte der Zeit keine Veränderungen der NADH Fluoreszenz mehr stattfanden, entschieden wir uns, alle weiteren Versuche auf eine Versuchsdauer von 120 Minuten zu begrenzen.

In einem Vorversuch wurde die NADH Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen gemessen: bei einer Kontrollgruppe von insgesamt 10 Tieren wurde ohne Zugabe fluoreszenzmodulierender Substanzen, ebenfalls über einen Zeitraum von 120 Minuten, die

physiologische NADH Fluoreszenz registriert. Diese Messungen wurden als Kontrollwerte bezeichnet.
Um den angestrebten Vergleich zwischen physiologischer NADH Fluoreszenz und durch externe Verabreichung von NADH möglicherweise gesteigerter NADH Fluoreszenz durchführen zu können, wurden drei verschiedene NADH und NAD^+ Dosen sublingual verabreicht: 10, 50 und 100mg/kg. Diese Untersuchungen wurden an insgesamt 6 Gruppen durchgeführt. (Die Messungen der physiologischen NADH Fluoreszenz sowie der NADH Fluoreszenz nach Vorbehandlung mit NADH und NAD^+ erfolgte nicht am gleichen Tier).
Die Gruppengrösse pro Substanz und Konzentration, einschließlich Kontrollen, betrug 10 Tiere. Die Versuche erfolgten randomisiert.

NAD^+ wurde deshalb als Testsubstanz verwendet, weil wir überprüfen wollten, ob eine NAD^+ Gabe die kortikale NADH Fluoreszenz beeinflusst. NADH in einer Dosierung von 10mg/kg wurde zu Versuchsbeginn sublingual bzw. sublingual und buccal verabreicht. Über einen Zeitraum von 120 Minuten wurden NADH Fluoreszenz und Streulicht gemessen.
Für die Dosisbereiche NADH 50 und 100mg/kg wurde eine entsprechend konzentrierte NADH Lösung frisch zubereitet. 0,1ml der jeweiligen Lösung wurden über eine Mikrodialysepumpe (CMA/102, Schweden) sublingual verabreicht. Die Verbindung zwischen Spritze und Sublingualraum wurde über einen FEP Schlauch (fluoriertes Ethylenpropylen) hergestellt. Die NADH Lösung wurde in einer Geschwindigkeit von 15µl/min verabreicht. Vom Moment der Verabreichung wurden NADH Fluoreszenz und Streulicht über einen Zeitraum von 120 Minuten im Kortex der Ratte gemessen.
Analog zur Durchführung der Versuche mit NADH wurden in den Versuchen mit NAD^+ die in Abschnitt 3.1.4.1. beschriebenen NAD^+ Lösungen (10, 50 und 100mg/kg) über eine automatische Mikrodialysepumpe in den Sublingualraum einer narkotisierten Ratte geleitet, anschließend wurde die kortikale NADH Fluoreszenz über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen.
Nach Versuchsende wurde die Ratte durch intrakardiale Applikation einer letalen Dosis Chloralhydrat (2g/kg) euthanasiert. Die Messung wurde noch 15-30 Minuten nach Gabe desselben fortgeführt.

3.1.4.6. Versuchsauswertung und Statistik

Als Referenzpunkt wählten wird den NADH Fluoreszenzwert, der zum Zeitpunkt der Verabreichung der Pharmakons (ca. 30 Minuten nach Beginn der Messung) registriert wurde (Ausgangwert). Für jedes Tier wurde die NADH Fluoreszenz prozentual zum Ausgangswert dargestellt. Der NADH Fluoreszenzwert zum Zeitpunkt der Applikation (Ausgangswert) wurde auf 100% gesetzt.

Um Einflüsse durch hämodynamische Schwankungen, und als Folge davon Veränderungen der optischen Eigenschaften des Gewebes, zu minimieren, wendeten wir die von Harbig und Mitarbeitern (1970) entwickelte Korrekturformel an, bei der das Streulicht vom Fluoreszenzlicht subtrahiert wird (F-S).

Ein Fluoreszenz-Messwert entspricht dem Mittelwert von 16 Messungen, innerhalb von 4 Sekunden.

Ein Messzyklus dauert insgesamt 16,6 Sekunden. Innerhalb der ersten 4 Sekunden werden 16 Laserimpulse ausgesendet. Nach jedem ausgesendeten Impuls wird die NADH Fluoreszenzemission jeweils über einen Zeitraum von 2ns gemessen. Nach 16 Messungen erfolgt eine Pause von 12,6 Sekunden, dann beginnt der Messzyklus von neuem.

Die registrierten Daten stellen relative Messwerte dar, sie sind deshalb dimensionslos und werden auch als „arbitrary units“ bezeichnet.

Die Fluoreszenzwerte werden auf der y-Achse in Abhängigkeit der Zeit (x-Achse) graphisch dargestellt. Jede Graphik stellt die Mittelwerte ± Standardfehler einer Gruppe von jeweils 10 Tieren dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in der graphischen Darstellung nur jeder elfte Wert abgebildet. Das Intervall zwischen zwei dargestellten Messwerten beträgt 2,75 Minuten.

Da es sich bei den statistischen Daten um deskriptive Werte handelt, wurden die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt.

Für jedes Tier wurden die Mittelwerte mit Standardfehler berechnet. Aus den Werten der Einzeltiere der verschiedenen Versuchsgruppen (NADH 10,50 und 100mg/kg sowie NAD^+ 10,50 und 100mg/kg) wurde der Mittelwert mit Standardfehler berechnet und dargestellt. Diese wurden mit dem Mittelwert und Standardfehler der Kontrollgruppe verglichen.

Die Nullhypothese, es gibt keinen Unterschied zwischen Kontrolltieren und den mit der jeweiligen Dosis von NADH bzw. NAD^+ behandelten Tieren, wurde im Falle der mit NADH 100mg/kg behandelten Tieren abgelehnt, bei allen anderen untersuchten Gruppen (NADH 10 und 50 mg/kg sowie NAD^+ 10,50 und 100mg/kg) konnte die Nullhypothese nicht abgelehnt werden.

Ergänzend wurde die Fluoreszenzveränderung (von 0 – 120 Minuten nach NADH Applikation) in Abhängigkeit der Dosis auch als Fläche unter der Kurve dargestellt (area under the curve, AUC). Die Fläche unter der Kurve wurde nach der Trapezregel (AUC = {yi (xi+1 –xi) +(1/2)(yi+1-yi)(xi+1-xi)}) ermittelt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programmes Sigma Plot 8.0

Für alle Tiere wurde jeweils einzeln die AUC von 0-120 Minuten bestimmt. Der Mittelwert der AUC der Kontrolltiere wurde auf 100% gesetzt. Die Abweichung der AUC der mit NADH behandelten Tiere vom Mittelwert der Kontrolltiere wurde als Prozent dargestellt.

Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse und einem multiplen Vergleichstest (Holm-Sidak Test) auf Signifikanz berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat Version 3.00 (Jandel Scientific, Deutschland). Die Erstellung der Graphiken wurde mit SigmaPlot Version 8.00 (Jandel Scientific, Deutschland) durchgeführt.

3.2. Versuchsergebnisse

3.2.1. Intestinale Resorptionsquoten von Diazepam, g-Strophantin und NADH in drei verschiedenen Konzentrationen *in vitro*

Everted gut sac Darmpräparate wurden in Diazepam (1mg/l), g-Strophantin (1mg/l) und NADH Lösung (10,50 und 100mg/l) über einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der jeweiligen Substanz sowohl in der Inkubationslösung (B) als auch in der luminalen Flüssigkeit (C) mittels HPLC bestimmt.
Die Resorptionsquote wurde durch Berechnung des Quotienten C/B ermittelt. Abbildung 9 zeigt die Resorptionsquoten von Diazepam, Strophantin und NADH im Vergleich.
Diazepam wurde im Durchschnitt nach 30 minütiger Versuchsdauer zu 23,44 ±2,25% resorbiert, g-Strophantin hingegen wurde in derselben Zeit nur zu 11,78 ±1,33% resorbiert. Für NADH liegt die Resorptionsquote aller untersuchten Konzentrationen unterhalb der für g-Strophantin ermittelten Werte. Für die Konzentrationsbereiche NADH 10mg/l, 50mg/l und 100mg/l wurde eine respektive Resorptionsquote von 5,64 ± 0,53%, 3,57 ±0,51% und 4,71 ±0,8% gemessen.

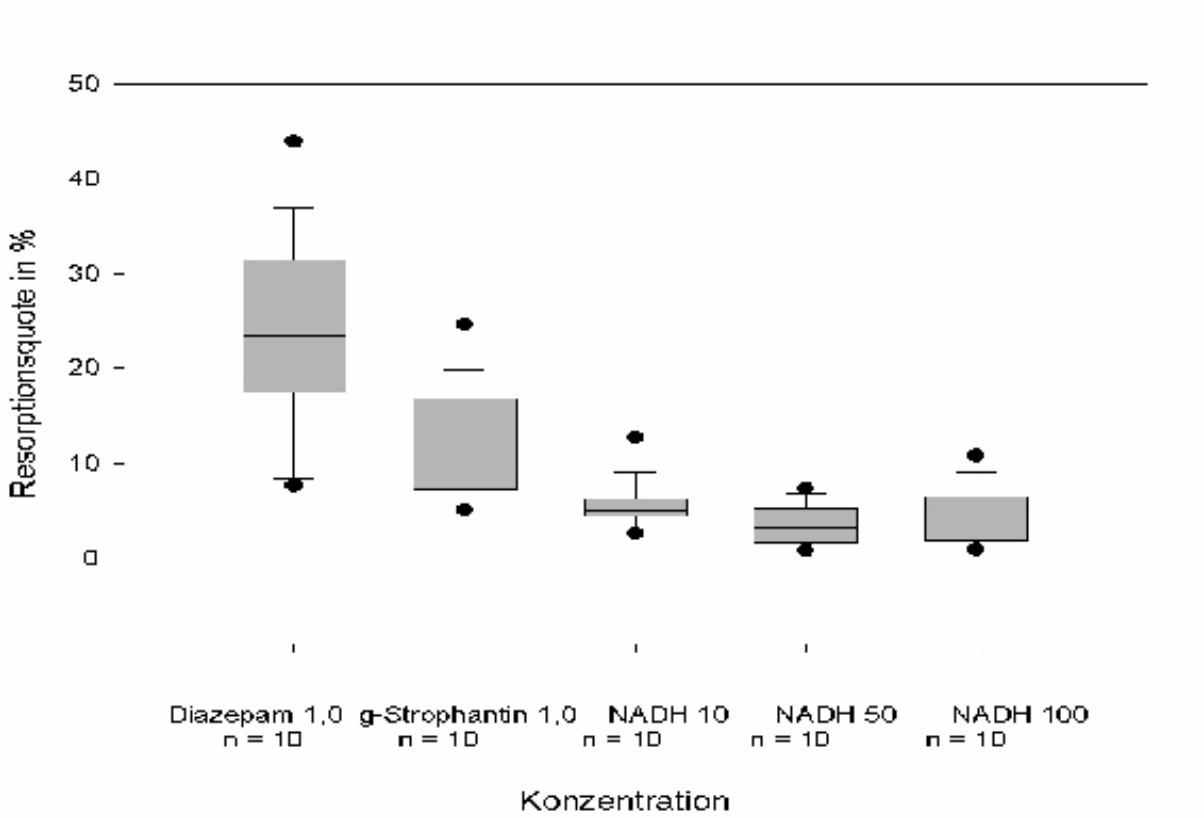


Abb.9: Vergleichende Darstellung der Resorptionsquoten (C/B) in % von Diazepam, g-Strophantin, NADH 10mg/l, NADH 50mg/l und NADH 100mg/l. Die Daten wurden am everted gut sac Modell *in vitro*, nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten ermittelt. Angegeben sind Mediane mit 25./75. Perzentile; n pro Gruppe = 10

3.2.2. Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der Ratte *in vivo* mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie

3.2.2.1. Messung der kortikalen NADH Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen

Zur Beurteilung der NADH Fluoreszenzänderungen nach externer Verabreichung von NADH führten wir 10 Versuche durch, bei denen ausschließlich die physiologische NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte, ohne Zugabe fluoreszenzmodulierender Substanzen, über einen Zeitraum von 120 Minuten registriert wurde. Diese Messungen wurden als Kontrolle bezeichnet.

In Abbildung 10 sind die Veränderungen der physiologischen NADH Fluoreszenz über einen Zeitraum von 120 Minuten dargestellt. In den ersten 60 Minuten nach Versuchsbeginn fällt die NADH Fluoreszenz um etwa -20% des Ausgangswertes (Definition siehe Material und Methoden). In den bis Versuchsende folgenden 60 Minuten bleibt das Fluoreszenzsignal auf diesem erniedrigten Wert.

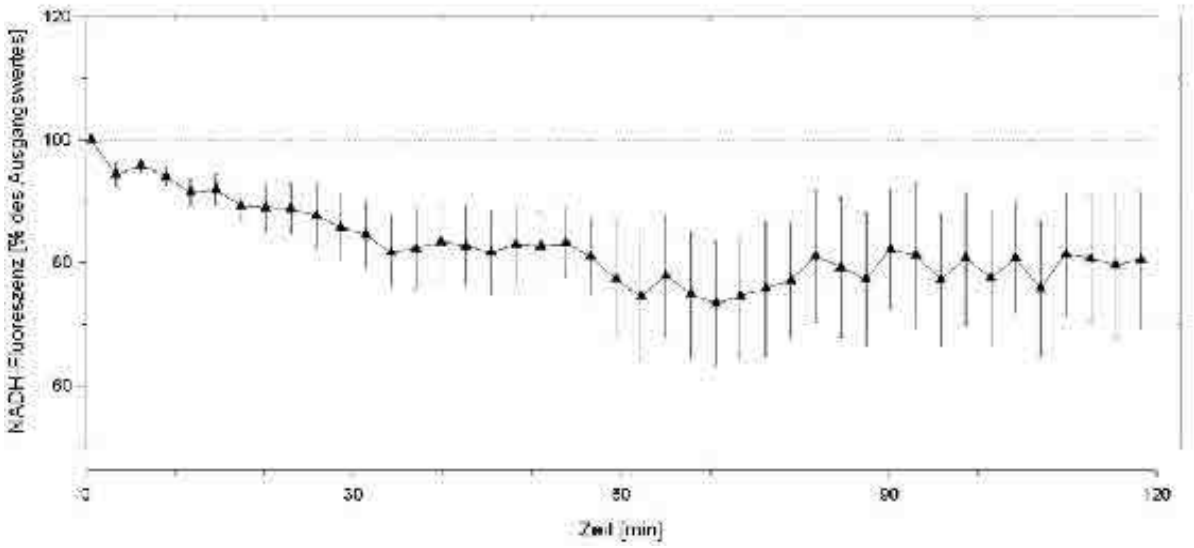


Abb.10:

Aufzeichnung der physiologischen NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten (Kontrollmessung). Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n = 10).

3.2.2.2. Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer letalen Dosis Chloralhydrat

Alle *in vivo* Versuche wurden durch intrakardiale Injektion einer letalen Dosis Chloralhydrat beendet. Da die Atmungskette mit Eintritt des Exitus zum Stillstand kommt, findet kein NADH Verbrauch mehr statt. Eine maximale Akkumulation von NADH, begleitet von einer entsprechenden Zunahme des Fluoreszenzsignals, ist die Folge.

Abbildung 11 zeigt, wie sich die Fluoreszenz durch Eintritt des Exitus verändert. Chloralhydrat wurde zum Zeitpunkt 0 Minuten verabreicht. Zum Vergleich wird ein durchschnittlicher Fluoreszenzausgangswert von 100 betrachtet. Innerhalb von 5 Minuten nach Applikation von Chloralhydrat steigt das Fluoreszenzsignal im Mittel um 45% des Ausgangswertes. Danach bleibt es über einen Zeitraum von 10-15 Minuten in etwa konstant.

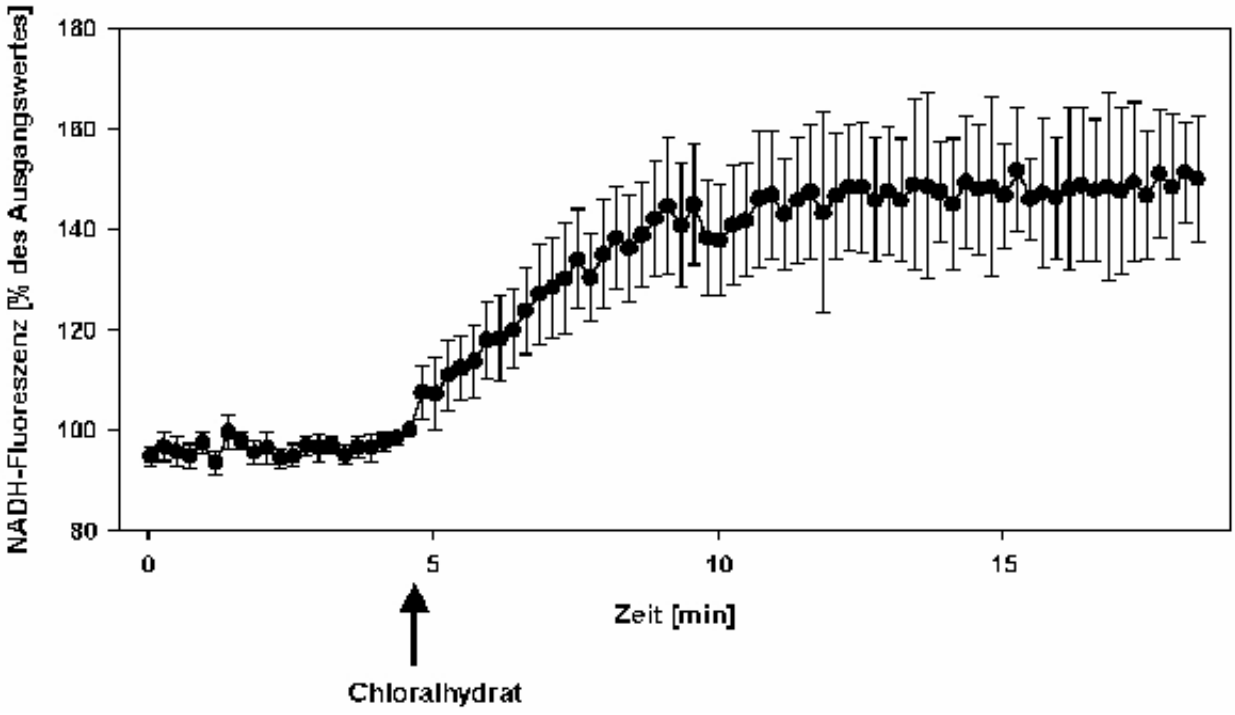


Abb.11:

Wirkung einer letalen Dosis Chloralhydrat auf die kortikale NADH-Fluoreszenz. Chloralhydrat wurde zum Zeitpunkt 0 verabreicht. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n = 10).

3.2.2.3. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NADH 10mg/kg

Nach sublingualer Gabe einer NADH Dosis von 10mg/kg wurde die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen.

Abbildung 12 zeigt die dabei stattfindenden Veränderungen der kortikalen NADH Fluoreszenz im Vergleich zur physiologischen NADH Fluoreszenz (Kontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler.

Das unter physiologischen Bedingungen gemessene Fluoreszenzsignal fällt innerhalb der ersten 60 Minuten um –20% des Ausgangswertes. In den verbleibenden 60 Minuten stabilisiert sich das Fluoreszenzsignal auf diesem erniedrigten Niveau. Das durch Gabe von NADH 10mg/kg hervorgerufene Fluoreszenzsignal zeigt im Vergleich zu den Kontrollmessungen keinen Unterschied im Graphikverlauf.

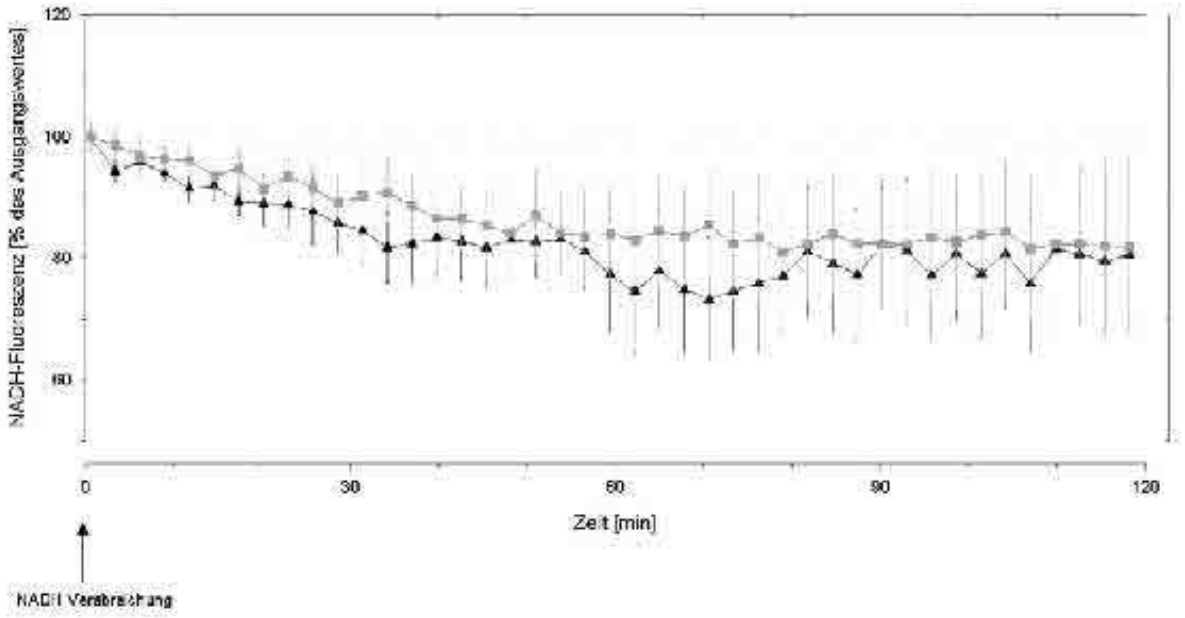


Abb.12:

Wirkung einer sublingual applizierten NADH Dosis von 10mg/kg auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10). ■ = NADH 10mg/kg. ▲ = Kontrollen.

3.2.2.4. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NADH 50mg/kg

Nach sublingualer Gabe einer NADH Dosis von 50mg/kg wurde die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten an insgesamt 10 Tieren gemessen. Abbildung 13 zeigt die dabei stattfindenden Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Das unter physiologischen Bedingungen gemessene Fluoreszenzsignal fällt innerhalb der ersten 60 Minuten um –20% des Ausgangswertes. In den verbleibenden 60 Minuten stabilisiert sich das Fluoreszenzsignal auf diesem erniedrigten Niveau

Nach Gabe von NADH 50mg/kg wurde keine deutliche Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen registriert.

Während bei den Kontrolltieren eine Abnahme der Signalstärke nach Versuchsbeginn um etwa -20% des Ausgangswertes gemessen wurde, betrug die Signalabnahme nach Gabe von NADH 50mg/kg nur circa -10% des Ausgangswertes.

Nach sublingualer Verabreichung einer Dosis NADH 50mg/kg stellt sich bereits 30 Minuten nach Versuchsbeginn eine konstante Signalstärke von etwa -10% des Ausgangswertes ein.

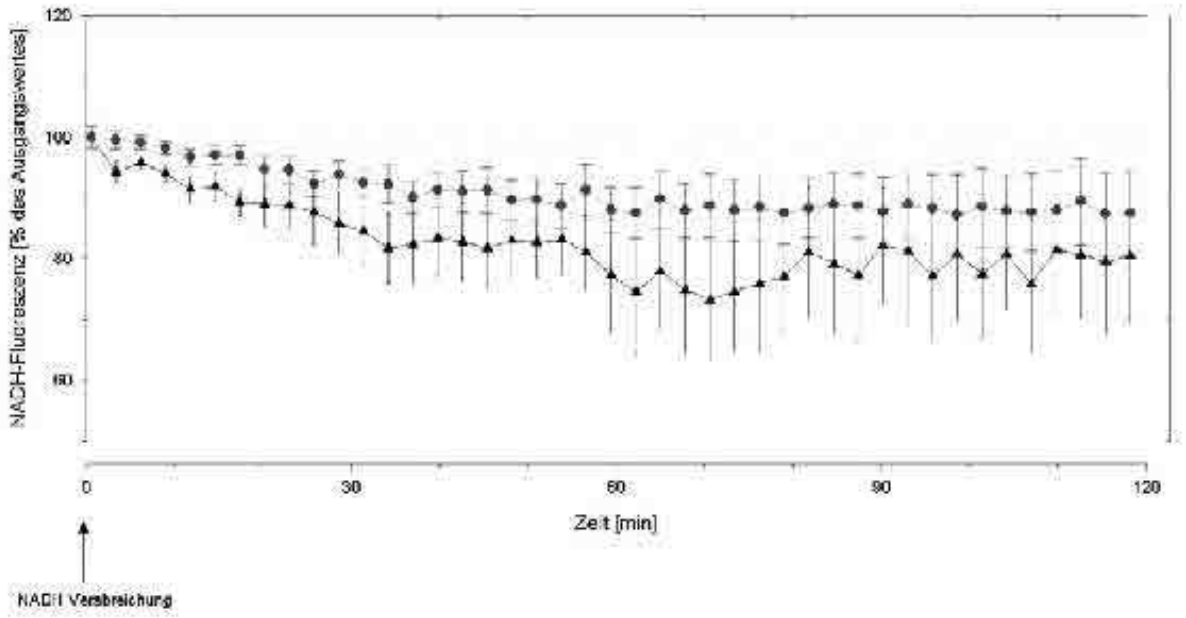


Abb.13:

Wirkung einer sublingual applizierten NADH Lösung (Dosis: 50mg/kg) auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10) ● = NADH 50mg/kg. ▲= Kontrollen.

3.2.2.5. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NADH 100mg/kg

Nach sublingualer Gabe einer NADH Dosis von 100mg/kg wurde die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten an insgesamt 10 Tieren gemessen.

Abbildung 14 zeigt die dabei stattfindende Fluoreszenzänderung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Das unter physiologischen Bedingungen gemessene Fluoreszenzsignal fällt innerhalb der ersten 60 Minuten um –20% des Ausgangswertes. In den verbleibenden 60 Minuten stabilisiert sich das Fluoreszenzsignal auf diesem erniedrigten Niveau.

Nach sublingualer Verabreichung von NADH 100mg/kg blieb das Fluoreszenzsignal innerhalb der ersten 60 Minuten auf einem konstanten Niveau. In der zweiten Versuchshälfte (60 – 120 Minute) konnte eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignales um +28% im Vergleich zu den Kontrollmessungen beobachtet werden.

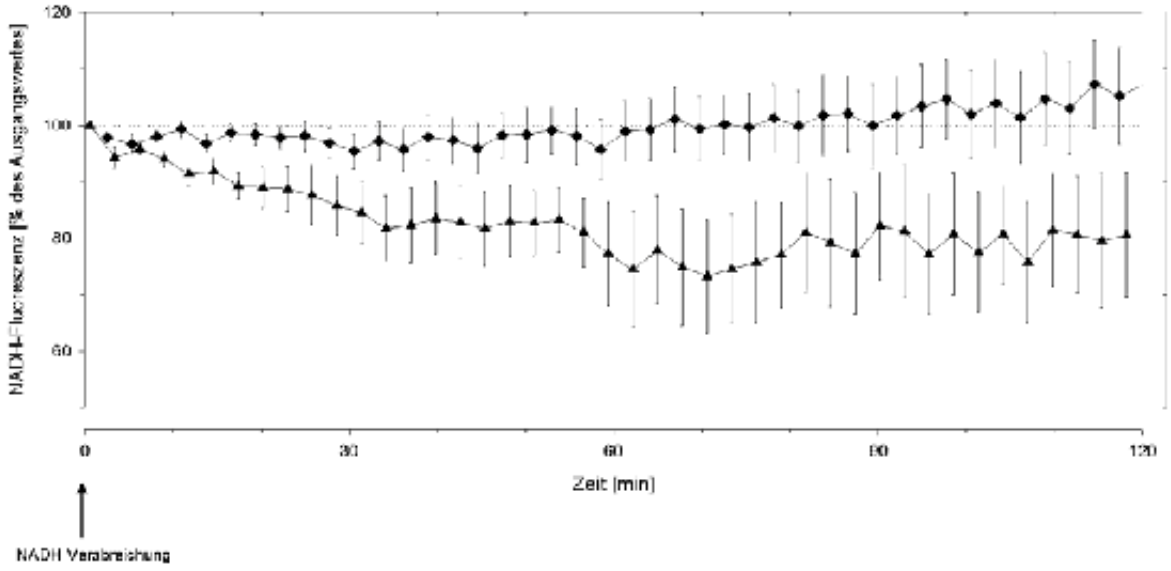


Abb.14:

Wirkung einer sublingual applizierten NADH Dosis von 100mg/kg auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10). ◆ = NADH 100mg/kg. ▲ = Kontrollen.

3.2.2.6. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NAD^+ 10mg/kg

Nach sublingualer Verabreichung einer Dosis NAD^+ 10mg/kg wurde die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten an insgesamt 10 Tieren gemessen.

Abbildung 15 zeigt, dass sich die NADH Fluoreszenz nach Gabe von NAD^+ 10mg/kg nicht von der Fluoreszenzaufzeichnung der Kontrollmessung unterscheidet. In beiden Fällen war in der ersten Versuchshälfte (0 – 60Minuten) eine Intensitätsabnahme um etwa -20% des Ausgangswertes zu beobachten. In der zweiten Versuchshälfte (60 – 120Minuten) stabilisierten sich beide Fluoreszenzsignale auf diesem erniedrigten Niveau.

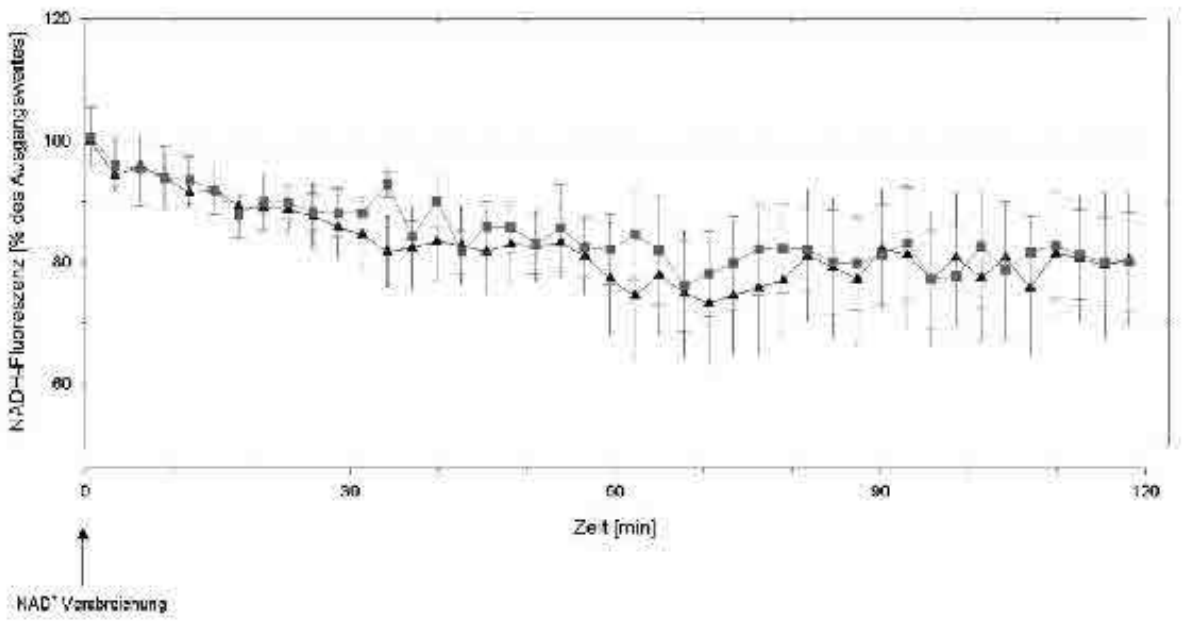


Abb.15:

Wirkung einer sublingual applizierten NAD^+ Lösung (Dosis: 10mg/kg) auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10). ■ = NAD^+ 10mg/kg. ▲ = Kontrollen.

3.2.2.7. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NAD^+ 50mg/kg

Nach sublingualer NAD^+ Gabe in einer Dosis von 50mg/kg wurde die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten an insgesamt 10 Tieren gemessen

Abbildung 16 zeigt, dass die Verabreichung von NAD^+ 50mg/kg keine deutliche Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen verursacht. Während unter physiologischen Bedingungen das Fluoreszenzsignal innerhalb der ersten 60 Minuten um -20% des Ausgangswertes fällt, ist nach Verabreichung von NAD^+ 50mg/kg eine Abnahme um etwa –15% des Ausgangswertes zu messen.

In der zweiten Versuchshälfte (60-120Minuten) verbleiben sowohl die Fluoreszenzwerte der Kontrollmessungen als auch die Fluoreszenzwerte nach Gabe von NAD^+ 50mg/kg auf diesem erniedrigtem Niveau.

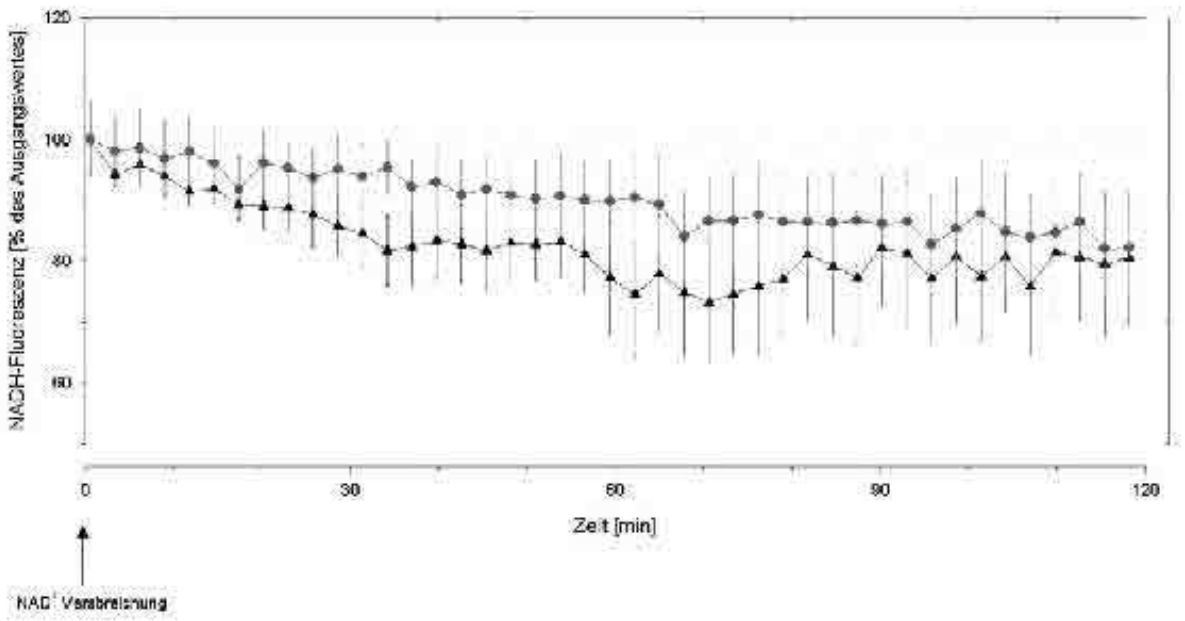


Abb.16:

Wirkung einer sublingual applizierten NAD^+ Lösung (Dosis: 50mg/kg) auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10). ● = NAD^+ 50mg/kg. ▲ = Kontrollen.

3.2.2.8. Veränderung der NADH Fluoreszenzmessung nach Verabreichung einer Dosis NAD^+ 100mg/kg

Nach sublingualer NAD^+ Gabe in einer Dosis von 100mg/kg wurde die NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte über einen Zeitraum von 120 Minuten bei 10 Tieren gemessen. Abbildung 17 zeigt die dabei stattfindenden Veränderungen der kortikalen NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Bei den Kontrollen wurde in den ersten 60 Minuten nach Versuchsbeginn eine Fluoreszenzabnahme um etwa -20% des Ausgangswertes und in den folgenden 60 Minuten eine Normalisierung des Signals auf diesem erniedrigtem Niveau beobachtet.

Nach Applikation von NAD^+ 100mg/kg wurde in den ersten 60 Minuten dagegen ein Anstieg der kortikalen NADH Fluoreszenz um etwa +15% im Vergleich zu den Kontrollmessungen registriert. In der zweiten Versuchshälfte ist das durch NAD^+ 100mg/kg hervorgerufen Fluoreszenzsignal um etwa 10% stärker als das Fluoreszenzsignal der Kontrollmessungen.

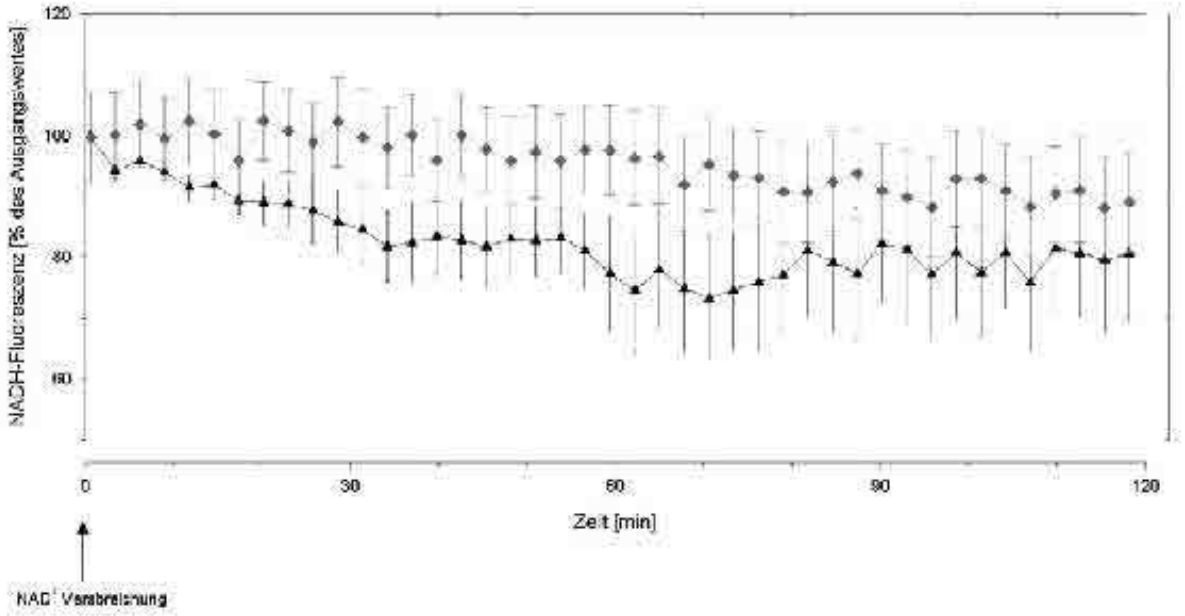


Abb.17:

Wirkung einer sublingual applizierten NAD^+ Lösung (Dosis: 100mg/kg) auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10). ◆ = NAD^+ 100mg/kg. ▲ = Kontrollen.

3.2.2.9. Zusammenfassung der *in vivo* Versuchsergebnisse

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus den Untersuchungen der kortikalen NADH Fluoreszenz nach Verabreichung von NADH (10,50 und 100mg/kg) und NAD^+ (10,50 und 100mg/kg) folgendes Bild:

Die sublinguale Verabreichung von NADH in einem Dosisbereich von 10 und 50 mg/kg hatte innerhalb eines Zeitraums von 120 Minuten post applicationem keinen Einfluss auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen.

Auch die sublinguale Verabreichung von NAD^+ in einem Dosisbereich von 10 und 50 mg/kg zeigte innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 120 Minuten post applicationem keinen Einfluss auf die kortikale NADH Fluoreszenz verglichen mit den Kontrollmessungen.

Nach sublingualer Verabreichung einer NADH Dosis von 100mg/kg konnte dagegen ein signifikanter Anstieg der kortikalen NADH Fluoreszenz im Zeitraum von 60 bis 120 Minuten post applicationem um +28% im Vergleich zu den Kontrollmessungen beobachtet werden.

NAD^+ sublingual in einer Dosis von 100mg/kg führte zu einem tendenziellen Anstieg der NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen.

Nachfolgend ist die korrigierte NADH Fluoreszenz als Fläche unter der Kurve (AUC) vom Zeitpunkt 0-120 Min dargestellt.

3.2.2.10. Darstellung der NADH Fluoreszenzzunahme als Fläche unter der Kurve nach sublingualer NADH Verabreichung

Abbildung 18 zeigt die Abweichungen der Mittelwerte der mit NADH behandelten Tiere (NADH 10,50 und 100mg/kg) im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollen in Prozent. Die Daten werden als Fläche unter der Kurve dargestellt.

Die Gegenüberstellung zeigt, dass eine direkte Abhängigkeit zwischen extern verabreichter NADH Dosis und Fluoreszenzintensität besteht. Mit steigender NADH Konzentration nimmt auch die im Kortex gemessene NADH Fluoreszenz zu. Während NADH 10mg/kg eine Fluoreszenzzunahme um circa 5% verursacht, ist bei NADH 50mg/kg bereits eine Steigerung um ca. 10% zu beobachten, für NADH 100mg/kg beträgt die gemessene Zunahme der Signalintensität etwa 25%.

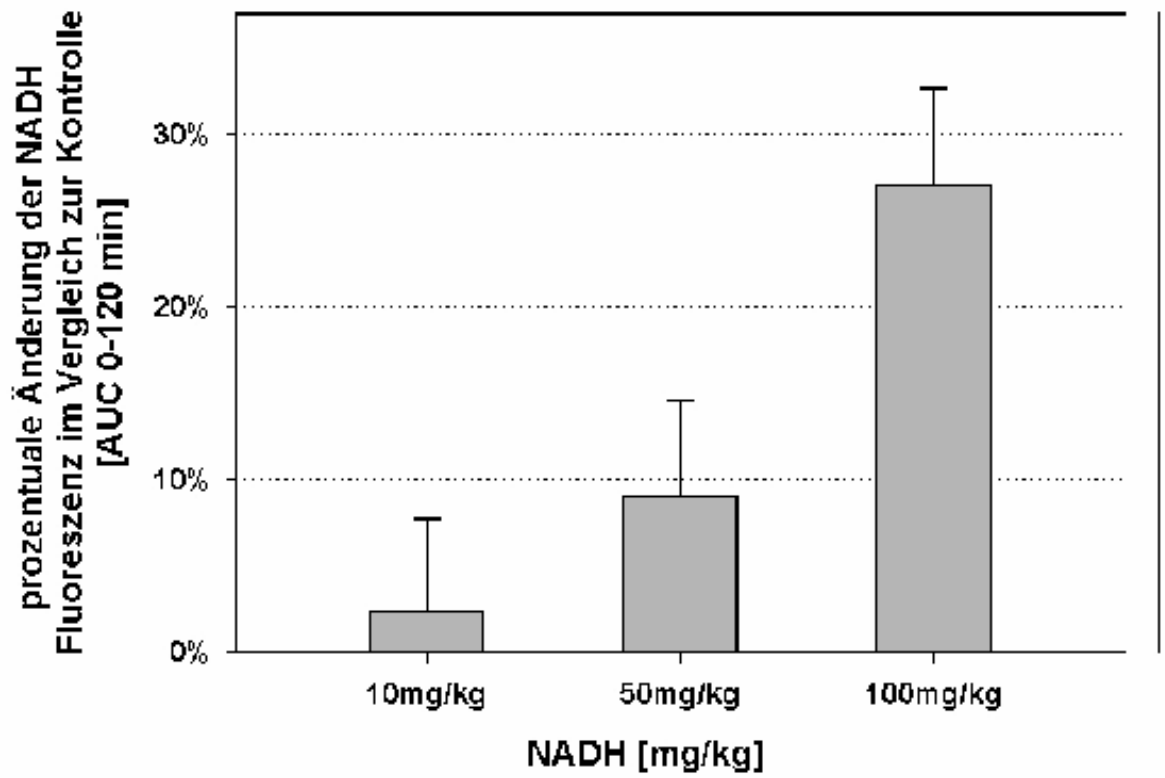


Abb.18:
Prozentuale Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz in der Zeit von 0 – 120 Minuten post applicationem von NADH im Vergleich zu den Kontrollen. Die Daten repräsentieren die Fläche unter der Kurve und sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. (n pro Gruppe = 10).

3.2.3.11. Darstellung der NADH Fluoreszenzzunahme als Fläche unter der Kurve nach sublingualer NAD^+ Verabreichung

Ebenso wie für die kortikale NADH Fluoreszenz nach Verabreichung dreier unterschiedlicher NADH Konzentration gilt auch für die NADH Fluoreszenz nach Applikation von NAD^+, dass die Intensität des gemessenen Fluoreszenzsignales dosisabhängig zunimmt. Für eine NAD^+ Konzentration von 10mg/kg wird eine Signalzunahme von weniger als 5% beobachtet, für NAD^+ 50mg/kg beträgt die Intensitätssteigerung etwa 10% und für NAD^+ 100 mg/kg etwa 17%.

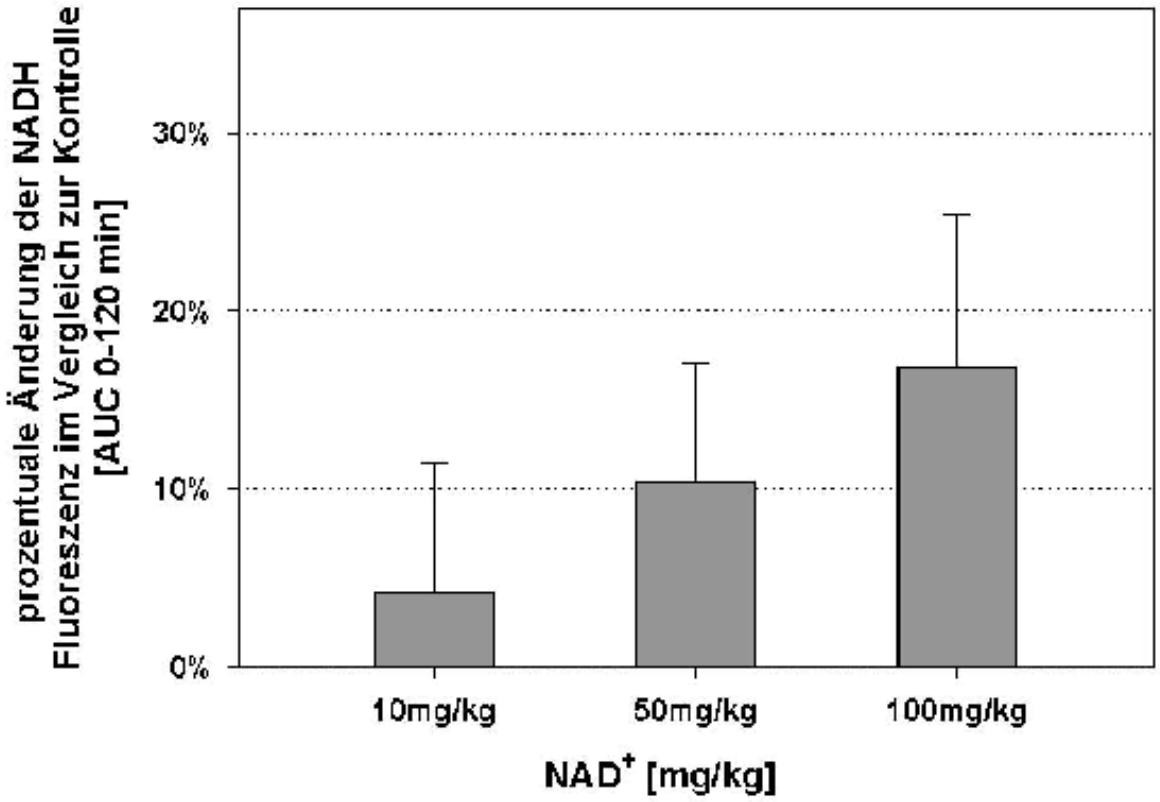


Abb.19:

Prozentuale Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz in der Zeit von 0-120 Minuten post applicationem von NAD^+ im Vergleich zu den Kontrollen. N pro Gruppe = 10. Die Daten repräsentieren die Fläche unter der Kurve (AUC) und sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

4. Diskussion

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Studien durchgeführt, deren Ziel es war, die Wirkung von extern verabreichtem NADH sowie dessen Vorläufern NAD^+ und Nicotinamid auf den Organismus zu untersuchen.
Die Wirkung von NADH wurde unter anderem im Rahmen der Parkinsontherapie (Birkmayer et al., 1989, 1991 und 1993), der Therapie von Depressionen (Birkmayer et al., 1991; Rex et al., 2004a) sowie in Bezug auf Gedächtnisleistung und Lernfähigkeit (Rex et al., 2004b, Yang et al., 2004) erforscht.
Kuhn und Mitarbeiter (1996) berichten nach intravenöser NADH Gabe (10mg/kg) von einer signifikant symptomatischen Verbesserung bei Parkinson Patienten. Die Evaluierung der Symptome vor und nach NADH Gabe erfolgte anhand der Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS). Birkmayer und Mitarbeiter (1993) bestätigen diese Ergebnisse.
Ebenso wurde NADH oral und parenteral (5-20mg/kg) an unter Depression leidenden Patienten verabreicht (Birkmayer et al., 1991). Die durchschnittliche symptomatische Verbesserung betrug 11,5%. Die antidepressive Wirkung von NADH ist durch Verhaltensversuchen an Ratten (Forced Swim Test) (Rex et al., 2004a) belegt. NADH wurde dabei in einer Dosis von 5-100mg/kg intraperitoneal verabreicht. Die durch NADH erzielte Verbesserung im Forced Swim Test entsprach in etwa der Wirkung herkömmlicher Antidepressiva wie beispielsweise Fluoxetin.
Experimentellen Einsatz fand NADH auch auf dem Gebiet des Lernverhaltens. Die Wirkung auf kognitive Leistung wurde im Morris water maze Test an Ratten untersucht. Mit diesem Test wird das räumliche Lernen von Ratten untersucht. NADH in einer Dosis von 10-100mg/kg intraperitoneal verabreicht führte bei älteren Ratten (22 Monate) zu einer verbesserten Lernfähigkeit im Vergleich zu den Kontrolltieren.
Die genannten Forschungsergebnisse sprechen dafür, dass NADH verschiedene Wirkungen im Organismus auslöst. In allen genannten Fällen wird spekuliert, dass der Ort, an dem NADH diese Wirkung auslöst, im ZNS zu finden ist. Es stellt sich daher die Frage, ob und wie NADH vom Organismus aufgenommen wird, bzw. ob es überhaupt nach peripherer Verabreichung in therapeutisch wirksamen Mengen ins ZNS gelangt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung dieser Fragen zu leisten.

Im ersten Teil der Arbeit untersuchten wir an einem *in vitro* Darmmodell, ob und inwieweit NADH intestinal resorbiert wird. Die Versuche wurden am everted gut sac Modell von Wilson und Wiseman durchgeführt. Der everted gut sac wurde in der Vergangenheit nicht nur zum Studium rein physiologischer Transportprozesse (Wilson und Wiseman, 1954) eingesetzt, sondern auch zur Resorption von Vitaminen (Heard et al., 1986, Hollander et al., 1976),

Hormonen (Farthin et al., 1982), Mineralstoffen (Feinroth et al., 1982) sowie verschiedener Pharmaka, u.a. der Herzglykoside (Forth et al., 1969, Kilic 2004). Der everted gut sac, ob in Originalversion nach Wilson und Wiseman oder in modifizierter Version (z.B. Barthe et al., 1998), ist eines der am häufigsten verwendeten *in vitro* Modelle zur Untersuchung der intestinalen Stoffaufnahme (Di Colo et al.,1980), das bis in die Aktualität Anwendung findet. Beispielsweise zur Untersuchung der Resorption anti-tumoröser Medikamente (Carreno-Gomez et al., 1999), außerdem wird das Modell zur Untersuchung der Absorptionskinetik in präklinischen pharmakologischen Studien empfohlen (Gandia et al., 2004).
Diesem Modell sind jedoch methodische Grenzen gesetzt, die bereits ausführlich auf Seite 39 beschrieben wurden; in erster Linie sei dabei an den fehlenden Blutfluss in der Darmwand erinnert. Viele Autoren setzten sich bereits mit der Frage auseinander, ob der everted gut sac trotz dieser Einschränkung wissenschaflich akzeptable Versuchsergebnisse liefern kann (Breschi et al., 1981, Plumb et al., 1987, Levine et al., 1970).
In der Diskussion um die Aussagekraft des everted gut sac wurde festgestellt, dass sich die besagte Methode zum Studium der intestinalen Stoffresorption eignet. Die gewonnenen Ergebnisse sind jedoch als qualitative Angaben zu sehen, die lediglich tendenziell eine semi-quantitative Aussage gestatten. Der everted gut sac erlaubt keine Aussage über die involvierten Transportmechanismen.

Aus diesem Grund war es nötig, Bezug zu den Resorptionsquoten anderer Substanzen herzustellen, deren Resorptionseigenschaften bekannt sind, um die Leistungsfähigkeit der Methode zu überprüfen und die Resorptionsquote von NADH besser einordnen zu können.
Als gut resorbierbare Substanz, bei der eine relativ hohe Resorptionsquote zu erwarten war, wählten wir das Benzodiazepin Diazepam, das nach oraler Gabe schnell und praktisch komplett enteral resorbiert wird (Mandelli et al., 1978; Rall, 1991).
Unsere Untersuchungen ergaben, dass Diazepam nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten zu ungefähr 25% im everted gut sac resorbiert wird.
Laut Literaturangaben zeigt Diazepam nach oraler Verabreichung eine Bioverfügbarkeit von 74-100% (Löscher et al., 1981, Roche Fachinformation, 1999, Bellantuono et al., 1980, Mandelli et al., 1978).
Es muss angemerkt werden, dass sich die aus der Literatur zur Verfügung stehenden Angaben ausschließlich auf die systemische Bioverfügbarkeit von Diazepam nach oraler Gabe beziehen, bei der neben der intestinalen Resorptionsquote auch die Magenpassage und ein potentieller First-pass Effekt in der Leber berücksichtigt werden (Fichtl, 2005, siehe auch S. 75)

Ein direkter Vergleich der Literaturangaben mit unseren Ergebnissen gestaltet sich deshalb als relativ kompliziert, weil unsere Versuche *in vitro* durchgeführt wurden, und somit ausschließlich die intestinale Resorptionsquote ermittelt wurde.
Es ist bekannt, dass die pharmakokinetischen Parameter von Diazepam eine große interindividuelle Variabilität aufweisen.

Nach oraler Verabreichung wird Diazepam rasch und nahezu vollständig resorbiert. Maximale Plasmakonzentrationen werden etwa ein bis zwei Stunden nach Applikation erreicht (Brown und Perry, 1973, Leal und Troupin, 1977, Roche Fachinformation, 1999, Bellantuono et al., 1980).
Unsere Versuche mit dem everted gut sac wurden nach dreißig Minuten beendet, da bei länger dauernden Versuchen mit diesem Modell die Integrität des Darmpräparates nicht gesichert werden kann. Auf Grund der kurzen Versuchszeit kann davon ausgegangen werden, dass das Diazepam in der externen Lösung noch nicht vollständig resorbiert werden konnte, so dass ein Wert von circa 25% ein Indikator für eine gute intestinale Resorptionsquote darstellt.

Eine andere mögliche Erklärung unserer Resorptionsquote könnte darin begründet sein, dass wir Versuche mit relativ niedrigen Dosen durchführten (1mg/l), da die Resorptionsquote der Benzodiazepine unter anderem von der angebotenen Dosis abhängt (Friedmann, 1992). Zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Diazepam beim Menschen werden in der Regel Dosen von 10-20mg eingesetzt.
Ergänzend muss angemerkt werden, dass die intestinale Resorptionsquote von Diazepam starke individuelle Schwankungen aufweist; Abweichungen bis zu 50% vom Mittelwert wurden beobachtet (Mandelli et al., 1978).

Als intestinal schlecht resorbierbare Sustanz wählten wir das polare Herzglykosid g-Strophantin. Strophantin wird beim Menschen enteral kaum resorbiert (0,4 - 4%) (Greeff, 1977, Küttler, 2002).
Neben der bekannten großen interindividuellen Variabilität (Küttler, 2002) spielen auch Speziesunterschiede bei der enteralen Resorption von Strophantin eine Rolle. So wird Strophantin bei Katzen und Hunden nach oraler Gabe zu 5 - 10% resorbiert (Adams, 1995).
Die aus der Literatur zur Verfügung stehenden Angaben zur Resorptionsquote von Strophantin differieren in Abhängigkeit der verwendeten Methode, der angebotenen Konzentration und der Inkubationszeit. Forth und Mitarbeiter (1969b) führten Untersuchungen an abgebundenen Jejunumsegmenten der Ratte durch; in diesem Fall betrug die Resorptionsquote von Strophantin 24%. In weiteren Untersuchungen an isolierten

und von einer Strophantinlösung durchströmten Jejunumschlingen *in vitro* sowie an abgebundenen Jejunumsegmenten der Ratte *in vivo* wurden geringere Resorptionsraten nachgewiesen (Forth und Rummel, 1968). Bei einer Konzentration von 100nM/ml (entsprechen 72,8mg/l) in der Durchströmungsflüssigkeit betrug die Resorptionsquote von Strophantin nach 60 Minuten 4,5%. Studien von Forth und Furkawa (1969a) an isoliert durchströmten Jejunumschlingen nach dem Modell von Fisher und Parsons sowie am Modell des everted gut sac bestätigen diese Ergebnisse.

Die von uns am everted gut sac ermittelte Resorptionsquote von 11,8% für g-Strophantin steht folglich in Einklang mit den aus der Literatur bekannten Angaben.

Die in unserem Versuchsaufbau ermittelten Resorptionsquoten von NADH in den Konzentrationen von 10, 50 und 100mg/l betrugen respektiv 5,64, 3,6 und 4,7%. Der Vergleich mit den Resorptionsquoten von Diazepam (22,44%) und Strophantin (11,8%) zeigt, dass NADH zumindest im geringen Ausmaß intestinal aufgenommen werden kann.

Wie bereits oben erwähnt, erlaubt das everted gut sac Modell in erster Linie Aussagen qualitativer Natur. In diesem Sinne kann die Frage nach der intestinalen Resorbierbarkeit von NADH positiv beantwortet werden.
Von einer Ausdehnung der Interpretation der Ergebnisse in den semi-quantitativen Bereich wird abgesehen, da bereits der Vergleich der Resorptionsquote von Diazepam und Strophantin zeigt, dass sich kein grosser quantitativer Unterschied zwischen einer theoretisch intestinal gut resorbierbaren und einer schlechter resorbierbaren Substanz einstellt.

Die intestinale Resorption eines Arzneimittels wird durch Molekülgröße, elektrische Ladung sowie Wasser- bzw. Fettlöslichkeit der Substanz beeinflusst. Eine grosse Molekülmasse und eine schlechte Löslichkeit verringern die Resorption.
Die Molekülgrösse von NADH beträgt 665,4 Dalton. Daten zum Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizient existieren laut Herrn Dr. Nadlinger, Direktor für Forschung und Entwicklung, Birkmayer Labor, Wien (persönliche Kommunikation) bis dato nicht. Es ist aber bekannt, dass NADH stark hygroskopisch ist und sich gut in Wasser löst.
Zum Vergleich sei erwähnt, dass nur Stoffe einer Molekularmasse von 100-400 gut durch die tight junctions passieren, welche die einzelnen Zellen der intestinalen Barriere miteinander verbinden. Diazepam, mit einem Molekulargewicht von 284,76, entspricht diesen

Bedingungen, nicht jedoch NADH, das sich mit einem Molekulargewicht von 665,4 deutlich oberhalb des Grenzwertes befindet.
Die von uns durchgeführten Versuche umfassten die Dosisbereiche NADH 10, 50 und 100mg/l. Im Rahmen klinischer Studien an Parkinsonpatienten wurden Dosen von NADH 5mg/kg intravenös verabreicht. Bei Untersuchungen an unter Depression leidenden Patienten wurden symptomatische Verbesserungen nach oraler und parenteraler Gabe von NADH im Dosisbereich von 5-20mg/kg beobachtet.
In Verhaltensversuchen mit Ratten, bei denen die antidepressive Wirkung von NADH untersucht wurde, betrug der Dosisbereich 5-100mg/kg. In Studien zur Verbesserung der Gedächtnisleistung wurde NADH intraperitoneal in einer Dosis von 10-100mg/kg verabreicht.
Der Vergleich zeigt, dass die von uns verwendeten Konzentrationen (NADH 10,50 und 100mg/l) das komplette Spektrum jener Dosen abdecken, die in Verhaltensversuchen mit Versuchstieren sowie in klinischen Studien am Menschen positive Wirkung gezeigt haben.

Soweit uns bekannt existieren lediglich Untersuchungen zur intestinalen Resorptionsquote von NADH Vorläufern wie Nicotinsäure (Niacin) und dem wasserlöslichem Vitamin B_3 (Nicotinamid). Sadoogh-Abassian und Evered führten 1980 Resorptionsstudien von Niacin und Nicotinamid am everted gut sac der Ratte durch. Dabei wurde folgende Beobachtung gemacht: sowohl Nicotinsäure als auch Nicotinamid werden im niedrigen Konzentrationsbereich (respektiv bis 4 und 6 mM) über einen sättigbaren Mechanismus resorbiert. In höheren Konzentrationsbereichen (bis 10mM) entspricht die Resorptionsquote einer linearen Funktion, d.h. mit zunehmender Konzentration in der Inkubationslösung steigt auch die Resorptionsquote der beiden untersuchten Substanzen.
Ausserdem wurden weder Nicotinsäure noch Nicotinamid gegen ihren Konzentrationsgradienten transportiert. Der Zusatz von 2,4-Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, hatte keine Auswirkung auf die Resorptionsquote. Beides spricht gegen die Existenz eines aktiven Transportmechanismus.
Die Autoren schlossen aus diesen Daten, dass Nicotinsäure und Nicotinamid über einen passiven Transportmechanismus resorbiert werden. Im niedrigen Konzentrationsbereich wird aufgrund der sättigbaren Kinetik eine Aufnahme über den Carrier-vermittelten Mechanismus der erleichterten Diffusion angenommen.

Ziel des zweiten Versuchabschnittes war es zu untersuchen, ob die sublinguale Verabreichung von NADH und NAD^+ zu einer Veränderung der kortikalen NADH Konzentration führt.

Es ist bekannt, dass die Schleimhaut der Mund- und Rachenhöhle gute Resorptionseigenschaften hat. Insbesondere bei sublingualer oder buccaler Gabe ist eine rasche Aufnahme eines Wirkstoffes mit relativ schnellem Wirkeintritt möglich. Inaktivierung bzw. Beeinflussung durch Magensaft und das Darmmilieu mit den entsprechenden Enzymen sowie eventuell resorptionsverzögernde Einflüsse des Speisebreis werden vermieden. Da sublingual oder buccal applizierte Arzneimittel nach erfolgter Resorption nicht unmittelbar die Leber passieren, findet auch keine sofortige Metabolisierung statt.

Die Versuche wurden *in vivo* an der narkotisierten Ratte durchgeführt, wobei Variationen der kortikalen NADH Fluoreszenz mit Hilfe der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie gemessen wurden. Die durch externe Gabe ausgelösten Fluoreszenzänderungen wurden mit der physiologischen kortikalen NADH Fluoreszenz verglichen.

Unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Zugabe fluoreszenzmodulierender Substanzen, war ein relativ niedriges NADH Fluoreszenzsignal messbar.

Es wurden verschiedene Dosierungsbereiche untersucht: NADH 10,50 und 100mg/kg sowie NAD^+ 10,50 und 100mg/kg.

Ausschließlich die Gabe von NADH 100mg/kg führte zu einer statistisch signifikanten Zunahme der kortikalen NADH Fluoreszenz. Für alle anderen untersuchten Dosierungsbereiche konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Tendenziell war jedoch auch nach Verabreichung von NADH 50mg/kg und NAD^+ 50 sowie 100mg/kg ein Anstieg der kortikalen NADH Fluoreszenz nachweisbar (siehe Abb. 17 und 18).

Diese Ergebnisse ergänzen Untersuchungen von Rex und Mitarbeitern (2002), bei denen unter Anwendung der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie ebenfalls Veränderungen der kortikalen NADH Fluoreszenz nach systemischer Gabe von NADH, NAD^+ und Nicotinamid untersucht wurden. Die Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz nach oraler Gabe wurde der Veränderung der kortikalen NADH Fluoreszenz nach intraperitonealen und intravenösen Applikation gegenübergestellt. NADH (10 und 50mg/kg) intravenös und intraperitoneal (50mg/kg) verabreicht löste eine signifikante Zunahme der kortikalen NADH Fluoreszenz aus, während nach Verabreichung von NADH intraperitoneal (10mg/kg) und oral (10mg/kg) keine Zunahme der kortikalen NADH Fluoreszenz zu beobachten war.

NAD^+ dagegen konnte nur nach intravenöser Gabe (10 und 50mg/kg) einen signifikanten Anstieg der kortikalen NADH Fluoreszenz bewirken. Nach intraperitonealer (10 und 50mg/kg) Applikation war kein Effekt zu beobachten.

Ebenso hatte die Verabreichung von Nicotinamid intraperitoneal (10 und 50mg/kg) und oral (10mg/kg) keine Wirkung auf die kortikale NADH Fluoreszenz.

Unsere Ergebnisse, und die von Rex und Mitarbeitern (2002), deuten darauf hin, dass die Applikationsart eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit von NADH spielt.

Der limitierende Faktor in diesem Prozess ist die Anzahl der Barrieren, die eine Substanz vom Applikationsort bis zum Wirkort überwinden muss. Für einen oral verabreichten Wirkstoff sind die beiden wichtigsten zu überwindenden Hindernisse die Darmwand und die Blut-Hirn-Schranke. Sowohl bei intraperitonealer als auch bei sublingualer Gabe wird die Darmwand als verzögernder Faktor der Resorption umgangen.

Der sublinguale Applikationsweg zeichnet sich durch vergleichsweise gute Resorptionsbedingungen aus. Trotz der relativ kleinen Absorptionsfläche kommt es zu einer schnellen und effektiven Aufnahme. Die über sublinguale und buccale Schleimhaut aufgenommenen Wirkstoffe gelangen über die venösen Gefäße des Mundraumes direkt in die Vena cava superioris. Eine präsystemische Elimination durch den first-pass Effekt in der Leber wird deshalb vermieden (Forth et al.,1996). Ebenso entfällt die Magenpassage als limitierender Faktor. Aufgrund des extrem sauren pH Wertes im Magen kann es in vielen Fällen zu einer teilweisen Inaktivierung eines Wirkstoffes kommen.

Wirkstoffen, die intraperitoneal verabreicht werden, steht eine überaus grosse Resorptionsfläche zur Verfügung, wodurch eine schnelle Aufnahme in den Blutkreislauf garantiert ist. Die Aufnahme erfolgt allerdings in erster Linie in die Vena porta, weshalb ein Wirkstoffverlust durch den hepatischen First-pass Effekt in Betracht gezogen werden muss (Benet et al.,1990). Hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit ist der sublinguale Applikationsweg zweifelsohne dem intravenösen Verabreichungsweg vorzuziehen.

Aus unseren und aus den Ergebnissen von Rex und Mitarbeitern (2002), insbesondere aus der Beobachtung, dass NADH nach intravenöser Gabe zu einem fast sofortigen Anstieg der kortikalen NADH Fluoreszenz führt, kann ein wichtiger Schluss gezogen werden, nämlich, dass systemisch verabreichtes NADH zu einer Zunahme der zentralen NADH Konzentration führt.

Es kann jedoch bis jetzt noch keine Aussage darüber gemacht werden, ob extern verabreichtes NADH auch wirklich die Blutbahn verlässt und durch die Blut-Hirn- Schranke ins Gehirn gelangt, um dort zur Vergrößerung des NADH Pools beizutragen.

Denkbar wäre auch, dass ein peripherer Anstieg der NADH Konzentration zu einer Verschiebung des Laktat/Pyruvat Verhältnisses führt (Lance et al.,1985). Sowohl Pyruvat als

auch Laktat sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und es besteht die Möglichkeit, dass das dadurch im ZNS veränderte Laktat/Pyruvat Verhältnis zu einem sekundären Anstieg der NADH Konzentration im ZNS führt.

Das Gehirn ist gegen den restlichen Körper durch die Blut-Hirn-Schranke abgegrenzt. Diese stellt eine selektive Barriere dar, die zahlreiche Stoffe am Eindringen ins Gehirn hindert. Die Blut-Hirn-Schranke wird von den Endothelzellen der Gehirnkapillaren gebildet. Im Vergleich zu anderen Endothelzellen haben diese ein geschlossenes, nicht gefenstertes Epithel. Einzelne Zellen sind durch tight junctions miteinander verbunden. Nur an wenigen Orten existiert ein gefenstertes Epithel, das eine grössere Durchlässigkeit erlaubt, z.B. Area postrema, Plexus choroideus und Tuber cinereum (Kahle, 1991).
Prinzipiell wird die Resorption durch die Blut-Hirn-Schranke von den gleichen Faktoren bestimmt wie die Resorption an allen anderen organischen Zellmembranen. D.h. lipidlösliche, nicht geladene und nicht an Proteine gebundene Wirkstoffe können die Blut-Hirn-Schranke problemlos überwinden (Rall, 1971).
Nach Verabreichung von NAD^+ konnte, ausgenommen nach intravenöser Gabe (Rex et al., 2002), keine signifikante Erhöhung der kortikalen NADH Fluoreszenz gemessen werden. Die Beobachtung eines tendenziellen Anstiegs nach sublingualer Gabe von NAD^+ 50 und 100mg/kg legt jedoch die Vermutung nahe, dass zwischen reduzierter (NADH) und oxidierter (NAD^+) Form ein Fließgleichgewicht besteht. Eine rasche einseitige Zufuhr von NAD^+ führt dann zu einer Wiederherstellung dieses Fließgleichgewichtes, indem NAD^+ teilweise zu NADH reduziert wird, was die Zunahme der NADH Fluoreszenz erklären könnte.
Dass sowohl in unseren als auch in vorangegangenen Studien (Rex et al.,2002, Klaidmann 2001) nach sublingualer und nach intraperitonealer Gabe von NAD^+ nur ein minimaler Fluoreszenzanstieg gemessen werden konnte, ist vermutlich durch die erschwerte Resorption geladener Moleküle bedingt. Es wäre jedoch denkbar, dass nach längerer NAD^+ Vorbehandlungszeit eine Zunahme der NADH Fluoreszenz sichtbar würde.

Die gemessenen Fluoreszenzwerte stellen relative Werte dar, die in arbitrary units („dimensionslosen Einheiten“) ausgedrückt werden. Deshalb benötigt man zur Beurteilung ihrer Größenordnung Vergleichswerte z.B. in Form von Kontrollmessungen, welche das mögliche Ausmaß von Änderungen der kortikale NADH Fluoreszenz unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen zeigen. Eine andere derartige Vergleichsmessung stellt die Aufzeichnung der kortikalen NADH Fluoreszenz zum Zeitpunkt des Exitus letalis dar. Bei Eintritt des Exitus erfolgt eine Unterbrechung der Atmungskette, infolge dessen wird kein NADH mehr verbraucht, weshalb es zu einer schnellen Akkumulation desselben kommt. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren nach Verabreichung letaler

Dosen Barbiturat (Mottin et al.,1997) sowie nach intravenöser Gabe von T-61 und Kalium Chlorid (Mayevsky et al.,2002a) berichtet.
Mit spektroskopischen Methoden ist dieser Vorgang in Form einer Zunahme der Fluoreszenzintensität messbar.
Die parallel zum Exitus gemessenen Fluoreszenzwerte stellen außerdem die maximal möglichen Veränderungen dar, welche die kortikale NADH Fluoreszenz innerhalb eines Versuches erreichen kann. In unseren Versuchen wurde der Exitus durch intrakardiale Verabreichung einer Überdosis Chloralhydrat ausgelöst. Die dabei gemessene Steigerung der NADH Fluoreszenzintensität betrug +45% des Ausgangswertes.
Im Vergleich dazu wurde bei den von uns untersuchten Substanzen und Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der NADH Fluoreszenz nur nach Gabe von NADH 100mg/kg registriert. Der beobachtete Anstieg der Fluoreszenz betrug +8% des Ausgangswertes. D.h. der durch Eintritt des Exitus verursachte Anstieg der Fluoreszenzwerte war etwa 5,5 mal größer als der durch NADH 100mg/kg ausgelöste Fluoreszenzanstieg.
Dieser Unterschied ist aufgrund zweier Überlegungen zu erklären:
Im Ruhezustand wird etwa 70% der vom Gehirn konsumierten Gesamtenergie zur Aufrechterhaltung der physiologischen Neurotransmission verwendet (Shulman et al., 2004), d.h. der Energieverbrauch durch Basalaktivität ist relativ hoch. Das bedeutet auch, dass der durch zusätzliche neuronale Aktivität entstehende Energiebedarf im Vergleich zum Basalbedarf relativ niedrig ist. Bei Eintritt des Exitus kommt es zum Stillstand der physiologischen Grundfunktionen, so auch der zerebralen Neurotransmission. Da keine Energie und folglich auch kein NADH mehr verbraucht wird, kommt es zu einem extrem hohen Anstieg der NADH Fluoreszenz.
Im Vergleich dazu ist zu bemerken, dass die Messung der NADH Fluoreszenz nach Gabe von NADH 100mg/kg im narkotisierten Zustand stattfand. Wie weiter unten genauer erklärt, wird im narkotisierten Zustand weniger Energie verbraucht als im Wachzustand.
Eine erhöhte Ausgangsfluoreszenz sowie die Zugabe einer nur geringen Menge NADH (100mg/kg) führt zu einer relativ kleineren Zunahme der Fluoreszenz als die durch den Exitus hervorgerufene Zunahme der Fluoreszenz.

Die Tatsache, dass wir unsere Versuche am narkotisierten Tier durchführten, könnte ebenfalls eine Auswirkung auf die Grössenordnung der gemessenen Fluoreszenzwerte haben.
Im narkotisierten Zustand wird weniger Energie und folglich auch weniger NADH verbraucht. Es muss jedoch angemerkt werden, dass bisher noch keine Studien vorliegen, in denen die NADH Fluoreszenz im wachen und narkotisierten Zustand direkt verglichen wurde.

Ausserdem führt ein reduzierter Energiekonsum zur Ansammlung von Glukose, was wiederum eine Verschiebung des Gleichgewichtes $NADH/NAD^+$ zu Gunsten von NADH bewirken könnte und damit ebenfalls eine Steigerung des Fluoreszenzsignales mitbedingt.
Die genannten Überlegungen sprechen dafür, dass das im narkotisierten Zustand gemessene Fluoreszenzsignal höher sein müsste als ein entsprechendes Signal, das im wachen Zustand gemessen würde.
Prinzipiell sind Messungen am wachen, sich frei bewegenden Tier möglich (Mottin et al., 1997 und 2003), entsprechende Studien wären für die Zukunft wünschenswert.

NADH löst nach sublingualer Gabe einer Dosis von 100mg/kg eine statistisch signifikante Zunahme der kortikalen NADH Fluoreszenz aus. Geringere NADH Dosen, die ebenfalls sublingual verabreicht wurden, waren nicht in der Lage, derartige Veränderungen zu bewirken. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass NADH nach sublingualer Applikation die kortikale NADH Konzentration beeinflusst. Die beobachtete Wirkung ist konzentrationsabhängig.

5. Zusammenfassung

NADH ist eines der wichtigsten Coenzyme des Intermediärstoffwechsels. In den von der Verdauung bis zur eigentlichen Synthese von ATP zwischengeschalteten Prozessen fängt es freiwerdende energiereiche Elektronen ein und transportiert diese zum nächstfolgenden Reaktionsort. Besondere Bedeutung hat NADH als Elektronentransportmedium im Krebs-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung.
Zu diesem Zweck ändert NADH seinen Redoxzustand und wechselt zwischen oxidierter (energiearmer) Form NAD^+ und reduzierter (energiereicher) Form NADH nach Bedarf hin und her.

In den letzten Jahrzehnten entstanden mehrere Forschungsansätze, die von der zentralen Rolle des NADH ausgehend, dessen Einfluss auf pathogenetische und symptomatische Gesichtspunkte verschiedener Krankheiten, sowie dessen Einsatz als diagnostisches Hilfsmittel untersuchten (Mitochondriale Erkrankungen: Morbus Parkinson, Alzheimer; Tumordiagnostik etc.).

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, Aspekte der Pharmakokinetik von NADH zu untersuchen. Uns interessierte einerseits die Frage, ob NADH intestinal resorbiert werden kann. In einem zweiten Versuchsabschnitt untersuchten wir, ob sich die NADH Konzentration im Kortex der Ratte durch sublinguale Verabreichung desselben beeinflussen lässt. Weiterhin wurde geprüft, ob die Applikation der oxidierten Form NAD^+ die kortikale NADH Konzentration verändert.

Die erste Fragestellung wurde *in vitro* am everted gut sac Modell untersucht. Die Resorptionsquote von NADH wurde mit den Resorptionsquoten von Diazepam, einer intestinal gut resorbierbaren Substanz, und g-Strophantin, einer intestinal schlecht resorbierbaren Substanz, verglichen. Alle für NADH erhaltenen Werte lagen unterhalb der Resorptionsquote von g-Strophantin. Die Resorptionsquoten von NADH 10, 50 und 100mg/kg unterschieden sich kaum von einander.

Das Redoxsystem $NADH/NAD^+$ besitzt optische Eigenschaften, die es geradezu ideal für den Nachweis mittels spektroskopischer Verfahren, wie der laserinduzierten Fluoreszenzspektroskopie (LIF), machen. Ausschließlich die reduzierte Form NADH reagiert auf die Bestrahlung der Wellenlänge 340nm mit Emission eines charakteristischen

Fluoreszenzsspektrums (Maximum bei λ = 465nm). Das emittierte Fluoreszenzsignal ist der intrazellulären NADH Konzentration proportional.

Die zentrale Bioverfügbarkeit von NADH nach sublingualer Verabreichung dreier unterschiedlicher Dosen NADH (10, 50 und 100mg/kg) und NAD^+ (10, 50 und 100mg/kg) wurde im Kortex der narkotisierten Ratte unter Anwendung eines laserinduzierten fluoreszenzspektroskopischen Verfahrens untersucht.
Dabei wurde festgestellt, dass die zentrale Bioverfügbarkeit von NADH ausschließlich nach Gabe von NADH 100mg/kg derart beeinflusst wird, dass es zu einem signifikanten Anstieg der NADH Fluoreszenz im Kortex kommt.
Die Beobachtung, dass die Verabreichung von NAD^+, einer im Prinzip nicht fluoreszierenden Substanz, ebenfalls einen Anstieg der kortikalen NADH Fluoreszenz bewirkt, spricht für die Existenz eines Fließgleichgewichtes zwischen NADH und NAD^+.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird geschlossen, dass Resorption und zentrale Verfügbarkeit von NADH bei der Ratte dann möglich sind, wenn es sublingual in einer Dosis von 100mg/kg verabreicht wird.

6. Summary:

Examination of NADH pharmacokinetic in vivo and in vitro

NADH is one of the most important coenzymes of the intermediary metabolism. During the processes ranging from digestion to the eventual synthesis of ATP, it is in charge of capturing free electrons and transporting them to the site of reaction. The critical role of NADH as the primary source of reducing equivalents is most prominent in the Krebs cycle and in oxidative phosphorylation.

In light of the central role of NADH within energy metabolism, in recent decades many research approaches have emerged examining its influence on pathogenic and symptomatic parameters (Mitochondrial diseases: Alzheimer's disease, Parkinson's disease) as well as its use as a diagnostic tool (tumor diagnosis).

The present study aims at analyzing certain aspects of NADH pharmacokinetic. First, we investigated whether NADH is indeed absorbed by the intestine. In a second step we focused on the question whether sublingually administered NADH is able to influence NADH concentration within the cerebral cortex of the rat.
In addition, changes in cortical NADH fluorescence were examined prior to administration of the oxidized analogue NAD^+.

The preliminary experiment was undertaken *in vitro* using the everted gut sack model.
The absorption rate of NADH was compared to Diazepam, a substance that is absorbed well through the intestinal wall, and Strophantine, known to be poorly absorbed by the intestine. The data obtained for NADH was in all cases below the Strophantine absorption rate. Statistical analysis of the absorption rates of the three NADH doses (NADH 10, 50 and 100mg/kg) studied revealed no significant differences.

$NADH/NAD^+$ redox-system is endowed with properties ideally suited for spectroscopic detection, such as laser-induced fluorescence spectroscopy. Only the reduced form NADH reacts to radiation (λ = 340nm) with the emission of a characteristic fluorescence spectrum (maximum at λ = 464nm). The signal emitted is proportional to intracellular NADH concentration.

Employing a laser-induced fluorescence spectroscopic detection technique, we studied the central bioavailability of NADH in the cortex of anaesthetized rats following sublingual administration of three different NADH dosages (10mg/kg, 50mg/kg and 100mg/kg).

The data collected revealed that central bioavailabiliy of NADH was only considerably influenced by a dose of NADH 100mg/kg, showing a significant increase in cortical NADH fluorescent signal.

The fact that the administration of NAD^+, a non-fluorescent compound, also induces a rise in cortical NADH fluorescence, is consistent with the notion that there is an equilibrium between the low-energy form NAD^+ and the high-energy form NADH.

On the basis of the data obtained, we conclude that absorption and central bioavailability of NADH in rat is possible when applied sublingually at a dose of 100mg/kg or above.

7. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2004)
Wie Zellen ihre Energie gewinnen
In Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.(eds.):
Molekularbiologie der Zelle.
Willey-VCH Verlag GmbH&Co, KGaA, Weinheim, 120-140

Ames, A. (2000)
CNS energy metabolism as related to function.
Brain Res Brain Res Rev. 34(1-2), 42-68

Arellano, C., Philibert, C., Lacombe, O., Woodley, J., Houin, G. (2004)
Liquid chromatographic-mass spectrometric method to assess cytochrome P450-mediated metabolism of testosterone by rat everted gut sacs.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 5, 807(2), 263-270

Auterhoff, H., Knabe, J., Höltje, H.-D. (1994)
Vitamine
In Auterhoff, H., Knabe, J., Hötje, H.-D. (eds.): Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, 697-740

Azzam, R.M., Notarianni, L.J., Ali, H.M. (1998)
Rapid and simple chromatographic method for the determination of diazepam and its major metabolites in human plasma and urine.
J Chromatorgr. 708: 304-309,

Barrientos, A., Moraes, C.T. (1999)
Titrating the Effects of Mitochondrial Complex Impairment in the Cell Physiology.
J Biol Chem. 274 (23), 4, 16188-16197

Barthe, L., Woodley, J.F., Kenworthy, S., Houin, G. (1998)
An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine.
Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 23(2), 313-23

Benet, L.Z., Mitchell, J.R., Sheiner, L.B. (1990)
Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución y eliminación de los fármacos
In Goodmann Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (eds.): Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
Editorial Medica Panamericana, Bogota/ Buenos Aires/ Caracas/ Madrid/ Santiago de Chile/ Sao Paulo, 21-48

Bergmeyer, H.U., Bernt, E. (1974)
Laktat Dehydrogenase: UV-Test mit Pyruvat und NADH
In Bergmeyer, H.U., Gawehn,K. (eds.): Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. 607-623

Bermejo Pareja, F., Perez, A., Vallejo, J.A.R. (1991)
Enfermedades abiotróficas o degenerativas.
In Bermejo Pareja, F. (ed.): Neurología Clínica Básica.
Ediciones Diaz de Santos, S.A., 567-606

Beal, M.F., Hyman, B.T., Koroshetz, W. (1993)
Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases?
Trends Neurosci. 16(4), 125-131.

Beal, M.F. (1995)
Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases.
Ann Neurol. 38(3), 357-366.

Bellantuono, C., Regí, V., Tognoni, G., Garattini, S. (1980)
Benzodiazepines: Clinical pharmacology and therapeutic use.
Drugs 19, 195-219

Beuthan, J., Zur C., Fink, F., Müller, G. (1990)
Laser Fluorescence spectroscopic experiments for metabolism monitoring.
Laser. Med. Surg. 6, 72-75

Beyer, H., Walter, W. (1991)
Aromatische Verbindungen. Heterozyklische Verbindungen. Enzyme
In Beyer, H., Walter, W., (eds.): Lehrbuch der Organischen Chemie
S.Hirzel Verlag, Stuttgart, 469-661, 703-820, 885-900

Birkmayer, W., Neumayer, E. (1969)
Neue Vorstellungen über die biochemischen Ursachen der Depression.
Therap Berichte, 41,146-152

Birkmayer, G.J.D., Birkmayer, W. (1989)
Stimulation of endogenous L-Dopa biosynthesis - a new principle for the therapy of Parkinson`s disease. The clinical effect of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and nicotinamide adenine dinucleotidephosphate (NADPH).
Acta Neurol Scand. 126, 183-187

Birkmayer, W., Birkmayer, G.J.D., Vrecko, K., Mlekusch, W., Paletta, B., Ott, E. (1989)
The coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) improves the disablilty of Parkinsonian patients.
J Neural Transm Dis Dement Sect. 1(4), 297-302

Birkmayer, G.J.D., Birkmayer, W. (1991)
The coenzyme Nicotinamide adenine diculeotide (NADH) as biological antidepressive Agent. Experience with 205 Patients .
New Trens Clin Neurpharmacol. 75-86.

Birkmayer, G.J.D., Vrecko, C., Volc, D., Birkmayer, W. (1993)
Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) – a new therapeutic approach to Parkinson's disease. Comparison of oral and parenteral application.
Acta Neurol Scand. 87, Suppl. 146, 32-35.

Bowling, A.C., Beal, M.F. (1995)
Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases.
Life Sci. 56(14), 1151-1171.

Brenner, O., De Lahunta, A., Cummings, J.F., Summers, B.A., Monachelli, M. (1997)
A canine encephalomyelopathy with morphological abnormalities in mitochondria.
Acta Neuropathol. 94(4),390-397

Breschi, C., Carelli, V., Di Colo, G., Nannipieri, E. (1981)
Effect of tissue degeneration on drug transfer across in vitro small intestine
Farmaco [Sci]. 36(3), 166-80

Browne, T.R., Penry, J.K. (1973)
Benzodiazepines in the treatment of epilepsy.
Epilpsia, 14, 277-310

Burdon, R.H. (1995)
Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation.
Free Rad Biol Med. 18, 775-794

Bushehri, N., Taylor Jarrell, S., Liebermann, S., Mirdamadi-Zonozi, N., Birkmayer, G., Preuss, H.G. (1998)
Oral reduced B-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) affects blood pressure, lipid peroxidation, and lipid profil in hypertensive rats (SHR).
Geriatr Nephrol Urol. 8, 95-100.

Byrne, E. (2002)
Does mitochondrial respiratory chain dysfunction have a role in common neurodegenerative disorders?
J Clin Neurosci. 9(5), 497-501

Carreno-Gómez, B., Woodley, J.F., Florence, A.T. (1999)
Studies of the uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs.
Int J Pharm. 183(1), 7-11

Cassarino, D.S., Bennett, J.P. Jr. (1999)
An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration.
Brain Res Brain Res Rev. 29(1), 1-25

Chance, B., Cohen, P., Jöbsis, F., Schoener, B. (1962)
Intracellular oxidation-reduction states in vivo.
Science, 137, 499-507

Cori, C.F. (1925)
The fate of sugar in the animal body. 1. The rate of absorption of hexoses and pentoses from the intetestinal tract.
J Biol Chem. 66, 691-715

Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, I. (2002)
Assessing antidepressant activity inrodents: recent developments and future needs.
Trends Pharmacol Sci. 23, 238-245

De Angelis, I., Hoogenboom, L.A.P., Huveneers-Oosprong, M.B.M., Zucco, F., Stammati, F., (1994)
Established cell lines of safety assessment of food contaminants: Differing furazolidone toxicity to V 79, HEp-2 and Caco-2 cells.
Food Chem Toxicol., 32 (5), 481- 488

Di Colo, G., Manzi, S., Nannipieri, E. (1980)
Outcome of the *in vitro* studies on drug absorption employing the isolated rat small intestine
Farmaco, 36(8), 692-704

Dizdar, N., Kågedal, B., Lindvall, B. (1994)
Treatment of Parkinson's disease with NADH.
Acta Neurol Scand. 90, 345-347,

Dora, E., Gyulai, L., Kovach, A.G. (1984)
Determinants of brain, activation-induced cortical NADH/NADH responses in vivo.
Brain Res. 299, 61-72

Enns, G.M. (2003)
The contribution of mitochondria to common disorders.
Mol Genet Metab. 80(1-2), 11-26.

Erecinska, M., Wilson, D.F. (1982)
Regulation of cellular energy metabolism.
J Membr Biol. 70, 1-14

Farthing, M.J., Vinson, G.P., Edwards, C.R., Dawson, A.M. (1982)
Testosterone metabolism by the rat gastrointestinal tract, in vitro and in vivo.
Gut, 23(3), 226-34.

Feinroth, M., Feinroth, M.V., Berlyne, G.M. (1982)
Aluminum absorption in the rat everted gut sac.
Miner Electrolyte Metab. 8(1), 29-35.

Fichtl, B. (2005)
Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie.
In Aktorier, Förstermann, Hofmann und Starke (eds.): Allgemein und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Urban und Fischer, München, Jena, 64-67

Fink, F., Pfarrherr, P. (1993)
Laser fluorescence spectroscopic experiments for monitoring molecules in brain.
In Dirnagel, U. (ed.): Optical imaging of brain function and metabolism,
Plenum Press, New York, USA: Plenum Press, 233-243

Fisher, R.B., Gardner, M.L.G. (1974)
Dependence of intestinal glucose absorption on sodium, studied with a new arterial infusion fechnique.
J Physiol. 241,235-260

Fisher, R.B., Parsons, D.S. (1949)
A preparation of surviving rat small intestine for the study of absorption
J Physiol. 110, 36-46

Forth, W., Rummel, W. (1968)
Vergleichende Untersuchungen der intestinalen Resorption von ^{3}H-markierten Herzglykosiden in vitro und in vivo.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 260(2), 112-114

Forth, W., Furukawa, E., Rummel, W., Andres, H. (1969a)
Intestinale Resorption von Herzglykosiden in vitro und in vivo.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 262,53-72

Forth, W., Furukawa, E., Rummel, W. (1969b)
Vergleichende Untersuchungen von Resorption und Ausscheidung tritium-markierter Herzglykoside
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 263(1), 206-208

Forth, W., Rummel, W. (1996)
Vitamine und Spurenelemente. Therapie des Vitamin und Spurenelementmangels
In Forth, W.,Henschler,D., Rummel, W. und Stark, K. (eds.): Allgemein und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 639-663

Friedman, H., Greenblatt, D.J., Peters, G.R., Metzler, C.M., Charlton, M.D., Harmatz, J.S., Antal, E.J., Sanborn, E.C., Francom, S.F. (1992)
Pharmacokinetics and pharmacodinamics of oral diazepam: effect of dose, plasma concentration, and time.
Clin Pharmacol Ther. 52(2), 139-150

Gandia, P., Lacombe, O., Woodley, J., Houin, G. (2004)
The perfused everted intestinal segment of rat. 1st communication: absorption kinetics of markers of different permeation mechanisms.
Arzneimittelforschung, 54(8), 467-73.

Gardner, A., Pagani, M., Wibom, R., Nennesmo, I., Jacobsson, H., Hällström, T. (2003a)
Alterations of rCBF and mitochondrial dysfunction in major depressive disorder: a case report
Acta Psychiatr Scand. 107, 233-239

Gardner, A., Johansson, A., Wibom, R., Nenesmo, I., von Dobeln, U., Hagenfeldt, L., Hällström, T. (2003b)
Alterations of mitochondrial function and correlations with personalty traits in selected major depressive disorder patients.
J Affect Disord. 76(1-3), 55-68

Greeff, K. (1977)
Zur Pharmakokinetik des g-Strophantins.
Dtsch Med Wochenschr. 102(4), 135-139.

Greenburg, S., Frishmann, W.H. (1990)
Co-enzym Q_{10}: A new drug for cardiovascular disease.
J Clin Pharmacol. 30,596-608

Guyton, A.C., Hall, J.E. (1996)
Transport of ions and molecules through the cell membrane.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (1996)
Transport of ions and molecules through the cell membrane.
In: Guyton, A.C., Hall, J.E. (eds.): Textbook of Medical Physiology
W.B. Saunders Company Philadelphia/London/Toronto/Montreal/Sydney/Tokyo, 43-55

Hageman, G.J., Stierum, R.H. (2001)
Niacin, poly(ADP-riobse)polymerase-1 and genomic instability.
Mutat Res. 475, 45-56

Harbig, K., Chance, B., Kovach, A., Reivich, M. (1976)
In vivo measurement of pyridine nucleotide flurescence from cat brain cortex.
J Appl Physiol. 41(4), 480-488

Hashimoto, M., Takeda, Y., Sato, T., Kawahara, H., Nagano, O., Hirakawa, M. (2000)
Dynamic changes of NADH fluorescence images and NADH content during spreading depression in the cerebral cortex of gerbils.
Brain Res. 872,294-300

Heard, G.S., Annison, E.F. (1986)
Gastrointestinal absorption of vitamin B-6 in the chicken (Gallus domesticus).
J Nutr. 116(1),107-20.

He, X.Y., Schulz H., Yang S.Y. (1998)
A human brain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is identical to an amyloid beta-peptide-binding protein involved in Alzheimer's disease.
J Biol Chem. 273(17), 10741-6.

Hogben, C.A.M. (1971)
Routes of Drug Administration: Biological Membranes and their Passage by drugs
In Eichler,O., Farah,A., Herken,H., Welch, A.D. (eds.): Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Vol XXVIII/1
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1-8

Hollander, D., Rin, E. (1976)
Vitamin K absorption by rat everted small intestinal sacs.
Am J Physiol, 231 (2), 415-419

Houin, G., Woodly, J. (2002)
Gastrointestinal absorption of drugs through the digestive barrier.
Ann Pharm. 60(6),365-71.

Houlton, J.E.F., Herrtage, M.E. (1980)
Mitochondrial myopathy in the Sussex spaniel
Vet Rec. 106, 206

Ince, C., Coremans, J.M., Bruining, H.A. (1992)
In vivo NADH Fluorescence.
Adv. Exp.Med. Oxygen Transport to Tissue XIV, 317, 277-296

Jacobs, R.W., Farivar, N., Butcher, L.L. (1985)
Alzheimer dementia and reduced nicotinamid adenine diculeotide (NADH) – diaphorase activity in senile plaques and the basal forebrain.
Neurosci Lett. 7, 39-44

Jöbsis, F., O'Connor, M., Vitale, A., Vreman, H. (1972)
Intracellular Redox Changes in Fucntioning Cerebral Cortex I Metabolic Effects of Epileptiform Activity.
J Neurophysiol. 34, 735-749

Kahle, W. (1991)
Gefäße
In Kahle, w. (ed.): Taschenatlas der Anatomie: Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York Deutscher Taschenbuch Verlag, 40

Kelber, O., Maidonis, P., Kroll, U., Weiser, D., Okpanyi, S.N. (2001)
Concentration dependency of the absorption of several plant extracts and their phytomedicinal combination (STW 5) in the ex vivo/in vitro model of the everted gut sack.
42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentell und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Mainz, 13.-15.3.2001

Kilic, F.S. Batu, O., Srimagul, B., Yildirim, E., Erol, K. (2004)
Intestinal absorption of digoxin and interaction with nimodipine in rats.
Pol J Pharmacol. 56(1), 137-141

Kish, S.J., Bergeron, C., Rajput, A., Dozic, S., Mastrogiacomo, F., Chang, L.J., Wilson, J.M., DiStefano, L.M., Nobrega, J.N. (1992)
Brain cytochormoe oxidase in Alzheimer's disease.
J Neurochem. 59(2), 776-9.

Klaidman, L.K., Leung, A.C., Adams, J.D. (1995)
High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oxidized and Reduced Pyridine Dinucleotides in Specific Brain Regions,
Ana Biochem. 228, 312-317

Klaidman, L.K., Mukherjee, S.K., Hutchin, T.P., Adams, J.D. (1996)
Nicorinamide as a precursor for NAD^+ prevents apoptosis in the mouse brain induced by tertiary-butylhydroperoxide.
Neurosci Letters, 206, 5-8

Klaidmann, L.K., Mukherjee, S.K., Adams, J.D. (2001)
Oxidative changes in brain pyridine nucleotides and neuroprotection using nicotinamide. Biochim Biophys Acta, 1525, 136-148

Klee, S., Ungemach, F.R., Kroker, R. (1990)
Secondary bioavailability of furazolidone. Studies in isolated perfused gut, intestinal and liver cells.
In: Residuos of veterinary drugs in food: Proceedings of the Euro-Residue conference
Noordwijkerhout, The Netherlands, 240-245

Klingenberg, M. (1974)
Nicotinamid-adenin-dinucleotide. Sprektrophotometrische und fluorimetrische Verfahren.
In Bergmeyer, H.U., Gaweh, K. (eds.): Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim Bergstr., 2094-2108

Kolb, E. (1974)
Allgemeine Physiologie
In Kolb, E.(ed.): Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena,35-74

König, F. (1995)
Die Bedeutung der Laserinduzierten Autofluoreszenz für die Früherkennung des Harnblasenkarzinoms.
Dissertation Humboldt-Universität Berlin

Kraut, A., Barbiro-Michaely, E., Mayevsky, A. (2004)
Differential effects of norepihephrine on brain and other less vital organs detected by a multisite multiparametric monitoring system.
Med Sci Monit. 10(7), 215-220

Kuhn, W., Müller, Th., Winkel, R., Danielczik, S., Gerstner, A., Häcker, R., Mattern, C., Przuntek, H. (1996)
Parenteral application of NADH in Parkinson`s disease: clinical improvement partially due to stimulation of endogenous levodopa biosynthesis.
J Neural Trans. 103, 1187-1193.

Lakowicz, J.R., Szmacinski, H., Nowaczyk, K., Johnson, M.L. (1992)
Fluorescence lifetime imaging of free and proteinbound NADH.
Proc. Natl. Acad.Sci. USA 89, 1271-1275

Lakowicz, J.R. (1999)
Fluorophores.
In Lakowicz, J.R. (ed.): Principles of Fluorescence Spectroscopy.
Kluwer Academic/Plenum Publishers New York, Dordrecht, London, Moscow, 63-93

Lance, C., Chauveau, M., Dizengremel, P. (1985)
The cyanide-resistent pathway of plant mitochondria.
In Douce and Day (eds.): Encyclopedia of plant physiology, New Series, vol.18
Springer Verlag Berlin, 202-247

Langguth, P., Bohner, V., Merkle, H.P., Biber, J. (1993)
Bürstensaummembranvesikel zur Untersuchung des intestinalen Absorption und des Metabolismus von Arzneistoffen.
Dtsch Apoth Ztg. 50, 4766-4770

Lauterbach, F., Gerber, C., Nitz, D., Presche, K. (1967)
Über Unterschiede im Mechanismus der enteralen Resorption kardiotoner Steroide und anderer Pharmaka..
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 257, 432-457

Leal, K.W., Troupin, A.S. (1977)
Clinical pharmacology of antiepileptic drugs: a summary of current information.
Clin Chem. 23,1964-1968

Levine, R.R., McNary, W.F., Kornguth, P.J., LeBlanc, R. (1970)
Histological re-evaluation of everted gut technique fro studying intestinal absorption.
Eur J Pharmacol. 9, 211-219

Liu, F.Q., Zhang, J.R. (2002)
Effect of NADH against liver cell line L02 apoptosis induced by UVB irradiation.
Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. Mar. 22(3), 232-4.

Lohmann, W., Mussmann, J., Lohmann, C., Kunzel, W. (1989)
Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 31(3), 249-53.

Löbert, V. (2003)
Etablierung von Laktat- und Pyruvatmessung im Plasma und Liquor cerebrospinalis zur Diagnostik von mitochondrialen Erkrankungen beim Hund.
Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

Löscher, W., Frey, H.-H. (1981)
Pharmacokinetics of Diazepam in the Dog
Arch int Pharmacodyn. 254, 180-195

Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Schulz, D.W., Rock, M.K. (1961)
The measurement of pyridine nucleotides by enzymatic cycling.
J Biol. Chem. 236, 2746-2755

Luft, R. (1997)
Historical overwiev of Mitochondrial Diseases
M.F. Beal,N. Howell (eds.) in: Mitochondria and free radicals in Neurodegenerative Diseases.
Wiley-Liss, New-York, 3-14

Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A. (1996)
Herzglykoside.
In Lüllmann, H., Mohr, H., Ziegler, A. (eds.): Taschenatlas der Pharmakologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 130-132

Mahler, H.R., Cordes, E.H. (1966)
Coenyzmes
In Mahler, H.R., Cordes, E.H. (eds.): Biological Chemistry.
Harper & Row John New York, 354-359

Maiese, K. (2001)
Elucidating neuronal and vascular injury through the cytoprotectice agente nicotinamide.
Curr Med Chem-Imm Endoc Metab Agents 1, 257-267

Maiese, K., Chong, Z.Z. (2003)
Nicotinamide: necessary nutrient emerges as a novel cytoprotectant for the brain.
Trends Pharmacol Sci. 24,5, 228-232

Mandelli, M., Tognoni, G., Garattini, S. (1978)
Clinical Pharmacokientics of Diazepam.
Clin Pharmacokin. 3, 72-91

Martilla, R.J., Roytta, M., Lorentz, H., Rinne, U.K. (1988)
Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain.
J Neural Trans. 74, 87-95

Martin, E., Rosenthal, R.E., Fiskum, G. (2005)
Pyruvate dehydrogenase complex: Metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress.
J Neurosci Res. 79(1-2), 240-247

Mayevsky, A. (1984)
Brain NADH redox state monitored in vivo by fibre optic surface fluorometry.
Brain Res. 319(1), 49-68

Mayevsky, A., Doron, A. Manor, T., Meilin, S., Zarchin, N., Ouaknine, G.E. (1996)
Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system.
Brain Res. 740, 268-274

Mayevsky, A., Manor, T., Meilin, S., Doron, A., Ouaknine, G.E. (1998)
Real-time multiparametric monitoring of the injured human cerebral cortex – a new approach.
Acta Neurochir Suppl. 71, 78-81

Mayevsky, A., Barbiro-Mihaely, E., Ligeti, L., MacLaughlin, A.C. (2002a)
Effects of euthanasia on brain physiological activities monitored in real-time.
Neurol Res. 24(7), 647-51

Mayevsky, A., Ornstein, E., Meilin, S., Razon, N., Ouaknine, G.E. (2002b)
The evaluation of brain CBF and mitochondrial function by fiber optic tissue spectroscope in neurosurgical patients.
Acta Neurochir Suppl. 81, 367-71

Mayevsky, A., Manor, T., Pevzner, E., Deutsch, A., Etziony, R., Dekel, N., Jaronkin, A.(2004)
Tissue spectroscope: a novel in vivo approach to real time monitoring of tissue vitality.
J Biomed Optics, 9(5), 1028-45

McGeer, K.G., McGeer, E.G., Wada, J.A. (1971)
Glutamic acid decarboxylase in Parkinson´s disease and epilepsy.
Neurology, 21(10), 1000-1007

Mitchell, P. (1961)
Coupling of phosphoryliation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.
Nature, 191, 144-191

Montgomery, E.B. Jr. (1995)
Heavy metals and the etiology of Parkinson's disease and other movement disorders.
Toxicol. 31,97(1-3), 3-9.

Mottin, S., Laporte, P., Jouvet, M., Cespuglio, R. (1997)
Determination of NADH in the rat brain during sleep- wake states with an optic fibre sensor and time-resolved fluorescence procedures.
J Neurosci. 79, 683-693

Mottin, S., Laporte, P., Cespuglio, R. (2003)
Inhibition of NADH oxidation by chloramphenicol in the freely moving rat measured by picosecond time-resolved emission spectroscopy.
J Neurosci. 84, 633-642

Mukherjee, S.K., Klaidman, L.K., Yasharel, R., Adams, J.D. Jr. (1997)
Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo.
Eur J Pharmacol. 2, 330(1), 27-34.

Navarro, A. (2004)
Mitochondrial enzyme activities as biochemical markers of aging.
Mol Aspects Med. 25(1-2), 37-48.

Nichol, C.A., Smith, G.K. , Duch, D.S. (1985)
Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin
Ann Rev Biochem. 54, 729-764

Orth, M., Schapira, A.H.V. (2002)
Mitochondrial involvement in Parkinson´s disease.
Neurochem Int. 40, 533-541

Parker, W.D. Jr., Parks, J., Filley, C.M., Kleinschmidt-DeMasters, B.K. (1994)
Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain.
Neurol. 44(6),1090-6.

Paschen, W., Niebuhr, I., Hossmann, K.A. (1981)
A bioluminescence method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slices.
J Neurochem. 36, 513-517

Passonneau, J.V., Lowry, O.H. (1974)
Nicotinamid-adenin-dinucleotide. Messung durch enzymatic cycling
In Bergmeyer,H.U., Gaweh, K.(eds.): Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim/ Bergstr, 2108-2122

Pellerin, L., Magistretti, R.J. (2004)
Let there be (NADH) Light.
Science, 305, 50-52

Perry, T.L., Godin, D.V., Hansen, S. (1982)
Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency?
Neurosci Lett. 13; 33(3), 305-10.

Pfeifer, L., Paul, R., Yalcin, E., Marx, U., König, F., Fink, F. (1996)
A time-gated laser spectrometer using optical fibres for detecting fluorescent biomolecules in cells and tissue.
In: Gonzales-Mora JL., Borges R., and Mas M. (Hrsg.): Monitoring Molecules in Neuroscience - 7th International Conference on *in vivo* Methods, Santa Cruz de Teneriffe/Spain; University of La Laguna, 42-43

Plumb, J.A., Burston, D., Baker, T.G., Gardner, M.L.G. (1987)
A comparison of the structural integrity of several commonly used perparations of rat small intestine *in vitro*.
Clin sci. 73, 53-59

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977)
Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.
Nature, 266, 730-732

Rall, D.P. (1971)
Drug entry into brain and cerebrospinal fluid.
In Eichler, O., Farah, A., Herken, H., Welch A.D (eds.) Handbuch der Experimentellen Pharmakologie XXVIII/1 Springer Verlag Berlin. Heidelberg. New York, 240-248

Rall, T.W. (1991)
Hipnóticos y sedantes; Etanol
In Goodmann Gilman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (eds.): Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica.
Editorial Medica Panamericana, Bogota/ Buenos Aires/ Caracas/ Madrid/ Santiago de Chile/ Sao Paulo, 345-380

Rapoport, S.M. (1975)
Pyridinnukleotide
In Rapoport, S.M.(ed.): Medizinische Biochemie
Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 218-228

Renault, G., Raynal, E., Sinet, M., Bertier, J.P., Godard, B., Cornillault, J. (1982)
A Laser fluorimeter for direct cardiac marabolism investigation.
Optics Laser Techn. 14, 143-148

Rex, A., Pfeifer, L., Fink, F., Fink, H. (1999)
Cortical NADH during pharmacological manipulations of the respiratory chain and spreading depression in vivo using laser induced fluorescence spectroscopy.
J Neurosci Res. 5, 57, 359-370

Rex, A., Pfeifer, L., Fink, H. (2001)
Determination of NADH in Frozen Rat Brain Sections by Laser-induced Fluoresecence.
Biol Chem. 382, 1727-1732

Rex, A., Hentschke, M-P., Fink, H. (2002)
Bioavailability of Reduced Nicotinamide-adenin-dinucleotid (NADH) in the Central Nervous System of the anesthetized rat measutre by laser-induced fluorescence spectroscopy. Pharmacology and Pharmacol Toxicol. 90(4), 220-225

Rex, A., Schickert, R., Fink, H. (2004a)
Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) in the forced swim test in rats.
Pharmacol Biochem Behav. 74, 303-307

Rex, A., Sypchalla, M., Fink, H. (2004b)
Treatment with reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) improves water maze performance in old wistar rats.
Behav Brain Res. 154, 149-153

Richter-Cooberg, U. (1984)
Resorption und Metabolismus von Dialkylnitrosaminen am Rattendarm in vitro.
Dissertation , Ludwig-Maximilian Universität München
(keine Journal-Nr im Original)

Richter, E., Strugala, G.J. (1985)
An all-glass perfusator for investigation of the intestinal transport and metabolism of foreign compounds in vitro.
J Pharmacol Meth. 14, 297-304

Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W.D., Schmidt, B., Reynolds, G.P., Jellinger, K., Youdim, M.B. (1989)
Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains.
J Neurochem. 52(2),515-20.

Riepe, M.W., Schmalzigaug, K., Fink, F., Oexle, K., Ludolph, A.C. (1996)
NADH in pyramidal cell layer of hippocampal regions CA1 and CA3 upon selective inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation.
Brain Res. 710, 21-27

Roche Fachinformation
Valium ® 10mg (2004)
In: FachInfo-Servie, Fachinformationsverzeichnis Deutschland. Herausgeber BPI Service GmbH, Frankfurt/Main

Rover, L. Jr., Fernández, J.C.B., de Oliveira Neto, G., Kubota, L.T., Katekawa, E., Serrano, S.H.P. (1998)
Study of NADH Stability Using Ultraviolet-visible spectrophotometric Analysis and Factorial Design.
Analyt Biochem. 260, 50-55

Rummel, W., Stupp, H.F. (1960)
Der Einfluss von Kalium und Calcium auf die Salz-, Glucose- du Wasserresorption des isolierten Dünndarms.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 240, 79-92

Sadanaga-Akiyoshi, F., Yao, H., Tanuma, S., Nakahara, T., Hong, JS., Ibayashi, S., Uchimura, H., Fujishima, M. (2003)
Nicotinamide attenuates focal ischemic brain injury in rats: with special reference to changes in nicotinamide and NAD^+ levels in ischemic core and penumbra.
Neurochem Res. 28(8), 1227-34

Sadoogh-Abasian, F., Evered, D.F. (1980)
Absorption of Nicotinic acid and Nicotinamide from rat small intestine in vitro
Biochimica et Biophysica Acta 598, 385-391

Satoh, M., Poirier, G., Lindhal, T., (1993)
NAD^+- dependent repair of damaged DNA by human cell extracts.
J Biol Chem. 268, 5480-5487

Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. (2000)
Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration,
Europ J Biochem. 267, 4904-4911

Schneckenburger, H., Gschwend, M.H., Strauss, W.S., Sailer, R., Kron, M., Steiner, R. (1997)
Energy transfer spectroscopy for measuring mitochondrial metabolism in living cells.
Photchem Photobiol. 66 (1), 34-41.

Shulman, R.G., Rothman, D.L., Behar, K.L., Hyder, F. (2004)
Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging.
Trends Neurosci. 27(8), 489-495

Silbernagl, S., Despopoulos, A. (1991)
Grundlagen der Zellphysiologie.
Silbernagl, S., Despopopoulos, A. (eds.) In: Taschenatlas der Physiologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, Deutscher Taschenbuch Verlag. 1-8

Skarda, R.T., Muir III, W.W., Hubbel, J.A.E., Bednarski, R.M. (1997)
Farmacos anestésicos intravenosos específicos.
In Skarda, R.T., Muir III, W.W., Hubbel, J.A.E., Bednarski, R.M (eds.).: Manual de Anestesia veterinaria.
Mosby/Doyma Libros, Times Mirror International Publishers División Iberoamericana, 113-132

Slade, N., Storga-Tominc, D., Birkmayer, G.D., Pavelic, K., Pavelic, J. (1999)
Effects of extracellular NADH on human tumor cell proliferation.
Anticaner Res. 19(6B), 5355-5360

Sohal, R.S. (1993)
The free radical hipótesis of aging: an appraisal of current status.
Aging (Milano), 5(1), 3-17

Stratford, M.R., Dennis, M.F., Hoskin, P., Philips, Hodgkiss, R.J., Rojas, A. (1996)
Nicotinamide pharmacokinetics in humans: effect of gastric acid inhibition comparison of rectal vs oral administration and the use of saliva for drug monitoring.
Br J Cancer, 74(1), 16-21

Strong, A.J., Harland, S.P., Meldrum, B.S., Whittington, D.J. (1996)
The use of in vivo Fluorescence Image Sequences to indicate the Occurrence and Propagation of Transient Focal Depolarizations in Cerebral Ischemia.
J Cereb Blood Flow Metab. 16(3), 367 -377

Stryer, L. (1996)
Obtención y almacenamiento de Energía metabólica. Glicólisis.
In Stryer, L. (ed.): Bioquímica.
Editorial Reverté, S.A. Barcelona-Bogotá-Buenos Aires-Caracas-Mexico, 319-335, 355-377,

Sundt, T.M., Anderson, R.E. (1975)
Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Fluorescence and Cortical Blood Flow in Ischemic and Nonischemic Squirrel Monkey Cortex. 1. Animal Preparation, Instrumentation, and Validity of Model.
Stroke, 6, 270-278

Swerdlow, R.H. (1993)
Is NADH effective in the treatment of Parkinson's Disease
Drugs Aging, 13(4), 263-268

Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Miller, S.W., Tuttle, J.B., Trimmer, P.A., Sheehan, J.P., Bennett, J.P. Jr., Davis, R.E., Parker, W.D. Jr. (1996)
Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease.
Ann Neurol. 40/4), 663-71

Thorniley, M.S., Lane, N.J., Manek, S., Green, C.J. (1994)
Non-invasive measurement of respiratory chain dysfunction following hypothermic renal storage and transplantation.
Kidney Int. 45(5), 1489-96

Vallejo Ruiloba, J. (1991)
Trastornos depresivos.
In Vallejo Ruiloba, J. (ed.): Introducción al Psicopatología y la psiquiatria
Masson, S.A. Salvat Medicina, 449-481

Verzár, F., McDougall, E.J. (1936)
Absorption from the intestine.
Longman, London

Vijayasarathy, C., Giger, U., Prociuk, U., Patterson, D.F., Breitschwerdt, E.B., Avadhani, N.G. (1994)
Canince mitochondrial myopathy associated with reduced mitochondrial mRNA and altered cytochrome c oxidase activities in fibroblasts and skeletal muscle.
Comp Biochem Physiol A Physiol. 109(4), 887-94

Vrecko, K., Birkmazer, J.G.D., Krainz, J. (1992)
Stimulation of dopamine biosynthesis incultured PC 12 phaecoromocytoma cells by the coenzyme nicotinamide adeninedinucleotide (NADH)
J Neural Transm [P-D Sect] (1993) 5:147-156

Vrecko, K., Storga, D., Birkmayer, J., Möller, R., Tafeit, E., Horejsi, Reibnegger, G. (1997)
NADH stimulstes endogenous dopamine biosynthesis by enhancing the recycling of tetrahyrobiopterin in rat phaeochromocytoma cells.
Biochim Biophy Acta, 1361, 59-65

Warburg, O., Christian W. (1934)
Co-Fermentproblem
Biochem. Z. 274,112-116

Wilson, T.H., Wiseman, G. (1954)
The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface.
J Physiol. 123, 116-125

Williams, G.H. (1991)
Vasculopatia hipertensiva
In Wilson, J.D., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Petersdorf, R., Martin, J.B., Fauci, A.S., Root, R.K (eds.): Harrison Principios de Medicina Interna.
Interamericana McGraw –Hill, 1160-1162

Windmüller, H.G., Späth, A.E. (1981)
Vascular autoperfusion of rat small intestine in situ.
Methods Enzymol. 77, 120-129

Yan, S.D., Soto, C., Chen, X., Zhu, H., al Mohanna, F., Collison, K., Zhu, A., Stern, E., Saido T., Tohyama M., Ogawa S., Roher A., Stern D. (1997)
An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer´s disease.
Nature, 389, 689-695

Yang, J., He, L., Wang, J., Adams, J.D. Jr. (2004)
Early administration of nicotinamide prevents learning and memory impairment in mice induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahyropyridine.
Pharmacol Biochem Behav. 78(1), 179-183

Ying, W., Alano, C.C., Garnier, P., Swason, R.A. (2004)
NAD^+ as a metabolic link between DNA damage and cell death.
J Neurosci Res. 79(1-2),216-223

Yong, G.C., Schwartz, J.A., Gardner, C.M., Sawaya, R.E., Steven, L.J. (1996)
Diagnostic potential of laser-induced autofluorescence emission in brain tissue.

Zarchin, N., Meilin, S., Rifkind, J., Mayevsky, A. (2002)
Effect of aging on brain energy-metabolism.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 132(1), 117-20.

Zhang, J.R., Vrecko, K., Nadlinger, K., Storga, D., Birkmayer, G.D., Reibnegger, G. (1998)
The reduced Coenzyme Nicotinamide Adenine Dinucleptide (NADH) rescues PC 12 Cells from Apoptosis.
J Tumor Marker Onkol. 13 (3), 11-18

Zubenko, G.S. (1989)
Endoplasimic reticulum abnormality in Alzheimer´s disease: selective alterations in platelet NADH – Cytochrome C reductase activity.
J Geriatr Psychiatry Neurol. 2, 3-10

Zubenko, G.S., Moossy, Y., Claasen, D. Martinez A.J., Rao, G.R. (1990)
Brain regional analysis of NADH- cytochrome C reductase activity in Alzheimer´s disease
J Neuropathol Exp Neurol. 49(3), 206-214

Danksagung

Frau Professor Dr. H. Fink danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die konstruktive Kritik bei der Durchführung und Korrektur dieser Dissertation.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. A. Rex für seine beständige Hilfe bei praktischen und wissenschaflichen Fragestellungen. Seine gleichzeitig professionelle und menschliche Art haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt Frau C. Bohnwagner für die gewissenhafte Durchführung der HPLC Analyse.

Danke an Alexej, Christine, Ralf und alle anderen gelegentlichen „Assistenten“ beim Narkotisieren der Ratten

Danke auch an Sarah Mannion für die kritische Durchsicht der summary

Danke an meine Eltern für die vielen Korrekturrunden, für alle ermutigenden und aufbauenden Worte auf diesem oft steinigem Pfad und für Euer immenses Vertrauen in mich.

Danke an Javi für sein kritisches „heilendes“ Auge und für die elektronische Unterstützung.

Danke an alle Kraftquellen auf diesem Weg, Balkantänzer, Salseras y Salseros und alle die ich noch vergessen habe. Und an Sandra por su compañia farmacológica, emocional y ahora profesional.

Lebenslauf

Name:	Kathrin Monika Kappes
Geburtstag:	3. Juli 1974
Geburtsort:	München
Eltern:	Dr. med. vet. Helga Kappes, Tierärztin Dr. med. vet. Hartmut Kappes, Tierarzt

Schulbildung:

1981 – 1994	Freie Waldorfschule Würzburg
1994	Abitur (Friedrich König Gymnasium Würzburg)

Akademische Ausbildung

1994 –1995	Studium der spanischen Sprachen an den Universitäten Alcalá de Henares und Complutense von Madrid
1995 - 1996	Veterinärmedizinische Universität Budapest
1996 – 2000	Veterinärmedizinische Universität Madrid
Dezember 2000	Approbation als Tierärztin

Beruflicher Werdegang:

Oktober 2000 bis August 2001	Teilzeitassistenz in einer Würzburger Kleintierpraxis
Februar bis Juni 2001	Freier Mitarbeiter als Übersetzer spanischer und englischer Texte am VetMed Labor Ludwigsburg
September 2001 bis März 2002	Internship an der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin
Seit April 2002	Doktorandin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
Mai 2002-September 2004	Vertretungen in verschiedenen Kleintierpraxen
Seit November 2004	Assistentin in einer Kleintierklinik in Osnabrück

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den