

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Prüfung der parenteralen und enteralen Bioverfügbarkeit
von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) im ZNS
der narkotisierten Ratte mittels
Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mike-Percy Hentschke

aus Moskau

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. R. Morgenstern
2. Priv.-Doz. Dr. U. Schmitt
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Rex

Datum der Promotion: 19.03.2010

	Seite	
1.	Einleitung	5
1.1.	Historie	5
1.2.	Die Pyridinnucleotide	6
1.3.	Biochemische Bedeutung von NADH	7
1.4.	NADH-Charakteristik	11
1.5.	Fluoreszenz	12
1.6.	Klinisch-chemische Analysen mit NADH	15
1.7.	NADH-Bestimmungsmethoden	16
1.8.	NADH in der Pathogenese und Therapie – vermutete klinische Wirkungen	21
1.8.1.	NADH und das Parkinson-Syndrom	22
1.8.2.	NADH und DNA-Reparatur	24
1.8.3.	NADH und Apoptose	24
1.8.4.	NADH und Depression	25
1.8.5.	NADH und Blutdruckregulation	26
1.8.6.	NADH und Chronisches Ermüdungssyndrom	26
1.8.7.	NADH und Muskelleistung	27
1.8.8.	NADH und Wellness-Drugs	28
2.	Aufgabenstellung	29
3.	Material und Methoden	30
3.1.	Tiermaterial	30
3.2.	Verwendete Substanzen	31
3.3.	Technische Durchführung	33
3.3.1.	Das Laserfluoroskop LF 302	33
3.3.2.	Herstellung der Messsonden	34
3.4.	Versuchsdurchführung	36
3.4.1.	Technische Vorbereitung und Wartung des Laserfluoroscops LF 302	36
3.4.2.	Versuchsablauf	37
3.4.3.	Besonderheiten bei Versuchen mit intraperitonealer, intravenöser, oraler und lokaler Applikation	40
3.4.4.	Versuchende	42
3.4.5.	Daten und statistische Auswertung	42
4.	Ergebnisse	44
4.1.	Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation von Chloralhydrat in letaler Dosierung	44
4.2.	Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach lokaler Applikation von NADH-Lösung	46
4.2.1.	Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach lokaler Applikation von NADH-Lösung	47
4.2.2.	Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach lokaler Applikation von NAD ⁺ -Lösung	48
4.3.	Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intravenöser Applikation	50
4.3.1.	Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intravenöser Applikation von NADH-Lösung	50

	Seite
4.3.2. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intravenöser Applikation von NAD-Lösung	51
4.4. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation	52
4.4.1. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation von NADH-Lösung	53
4.4.2. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation von NAD ⁺ -Lösung	55
4.4.3. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation von Nicotinsäureamid-Lösung	56
4.5. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach oraler Applikation	57
4.5.1. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach oraler Applikation von NADH	57
4.5.2. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach oraler Applikation von Nicotinsäureamid	58
4.5.3. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse	60
5. Diskussion	63
5.1. Applikation von Chloralhydrat in letaler Dosierung	66
5.2. Lokale (kortikale) Applikation von NADH- und NAD ⁺ -Lösung	67
5.3. Intravenöse Applikation von NADH- und NAD ⁺ -Lösung	69
5.4. Intraperitoneale Applikation von NADH-, NAD ⁺ - und Nicotinamid-Lösung	70
5.5. Orale Applikation von NADH und Nicotinamid	73
5.6. Schlussbetrachtung	75
6. Zusammenfassung	79
7. Literaturverzeichnis	81
8. Abkürzungen	92
9. Lebenslauf	93
10. Selbständigkeitserklärung	95

1. EINLEITUNG

1.1. HISTORIE

Nicotinamidnukleotide zählen zu den erstbeschriebenen Coenzymen. HARDEN und YOUNG fanden 1904, dass der Hefepresssaft nach BUCHNER in zwei Bestandteile getrennt werden kann, in eine nicht dialysierbare Fraktion - Zymase genannt - die die Enzyme enthielt und in eine wasserlösliche, hitzestabile Fraktion, die Cozymase. Strukturanalysen von Cozymase, welche besonders durch VON EULER et al. 1931 durchgeführt wurden, zeigten, dass dieses Molekül strukturell mit Adenosinmonophosphat vergesellschaftet ist. Die weitere Untersuchung der Cozymasestruktur wurde durch die Forschungen von WARBURG und CHRISTIAN vorangetrieben, die 1934 in Säugetiererythrozyten aus Pferdeblut einen dialysierbaren Kofaktor für die aerobe Oxidation von Glucose-6-phosphat lokalisierten. Die Wissenschaftler zeigten, dass dieses Coenzym aus 1 mol Adenin, 1 mol Nicotinamid, 2 mol Pentose (D-Ribose) und 3 mol anorganischem Phosphat besteht. Sehr bald erwies es sich, dass die Cozymase und das Coenzym von WARBURG chemisch eng verwandt sind. Die Cozymase enthält zwei Phosphate, während das Coenzym von WARBURG und CHRISTIAN drei Phosphate im Molekül besitzt [RAPOPORT, 1975]. Wie später gezeigt werden konnte, ist Cozymase ein Dinucleotid, in dem Nicotinamid und Adenin jeweils über Ribose an Pyrophosphorsäure gebunden vorliegt.

Das Coenzym wird nach neuer Terminologie als Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+) bezeichnet, obwohl ältere Begriffe wie Coenzym I (Co I) oder Diphosphopyridinnucleotid (DPN) noch gelegentlich verwendet werden. Das von WARBURG und CHRISTIAN 1934 isolierte Coenzym unterscheidet sich von NAD^+ nur durch ein zusätzliches, an der C-2 Hydroxylgruppe der Ribosehälfte des Adenin verestertes Phosphat. Dieses Coenzym wird Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP^+), bzw. in der älteren Literatur Coenzym II oder Triphosphopyridinnucleotid (TPN) genannt. Die Biosynthese von NAD^+ und NADP^+ erfolgt im Säugetier aus Nicotinamid oder Nicotinsäure (Niacin). Ein Mangel dieser Vorläufer führt beim Menschen zum Krankheitsbild der Pellagra [MAHLER, CORDES, 1971].

Bereits seit dem 18. Jahrhundert ist die Pellagra (ital.: pelle agra = raue Haut) bekannt.

1915 wurde die Pellagra von GOLDBERGER als eine Mangelkrankheit erkannt, welche durch entsprechende Ernährung (Leber, rohes Fleisch, Hefe) beseitigt werden kann. 1937 isolierte ELVEHJEM aus Leber einen bei Pellagra wirksamen Faktor (PP-Faktor, von Pellagra praeventium) und identifizierte ihn als Nicotinsäureamid [AUTERHOFF, 1994].

Normalerweise werden über 60% des Nicotinamidbedarfs aus dem Tryptophanstoffwechsel gedeckt. Der weitere Bedarf muss als Nicotinamid oder Nicotinsäure dem Organismus zugeführt werden. 60 mg Tryptophan werden zu etwa 1 mg Nicotinamid verstoffwechselt [FORTH, HENSCHLER, 1996].

NAD⁺ und NADP⁺ sind in viele Redoxreaktionen involviert, welche durch Dehydrogenasen katalysiert werden. Nachfolgend eine typische, durch die Alkoholdehydrogenase katalysierte Reaktion:



1.2. DIE PYRIDINNUCLEOTIDE

Im Allgemeinen katalysieren Dehydrogenasen die Wasserstoffübertragung von Substraten auf einen spezifischen Wasserstoffakzeptor, den man als zweites Substrat oder als Coenzym betrachten kann. Für die meisten wasserstoffübertragenden Enzyme wirken zwei Dinucleotide als Coenzyme, und zwar das Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) oder das Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP⁺).

Einer 1982 erschienenen Analyse von WHITE zufolge benötigen von 2123 in der „ENZYME NOMENCLATURE“ (1979) erfassten Enzymen 1097, d.h. 51,7%, ein Coenzym. Die Klasse der Oxidoreduktasen umfasst 554 Enzyme. Davon bedürfen 422 ein Coenzym. Bei 349 Enzymen ist dies das NAD⁺ oder NADP⁺. Berechnet über alle Enzymklassen sind NAD⁺ oder NADP bei 360 der 2123 erfassten Enzyme, d.h. bei 17 %, als Coenzym wirksam. Diese Zahlen charakterisieren die zentrale Rolle von NAD⁺ und NADP⁺ im Stoffwechsel [V. BRUCHHAUSEN, EBEL, 1993].

Diese Coenzyme werden aufgrund der Tatsache, dass sie Abkömmlinge des Pyridin enthalten und ihrer chemischen Natur nach Nucleotide, also Grundbausteine der Nukleinsäure sind, als Pyridinnucleotide zusammengefasst.

Pyridinnucleotide können reversibel Wasserstoffatome aufnehmen. In dieser Fähigkeit liegt ihre Coenzymfunktion bei der Wasserstoffübertragung begründet. In der dehydrierten Form liegt der Stickstoff als Pyridiniumkation vor. Bei der Wasserstoffaufnahme wird der Pyridinring reduziert, sodass er nur noch zwei Doppelbindungen enthält. Der Stickstoff verliert seine positive Ladung. Gleichzeitig wird ein Wasserstoffion frei. Mit der Hydrierung wird die aromatische Natur des Ringes aufgehoben, was die Lichtabsorption in charakteristischer Weise ändert. So hat das Dihydropyridinsystem eine spezifische Lichtabsorption mit einem Maximum bei $\lambda=340$ nm, während das Pyridinsystem in diesem Wellenlängenbereich kaum Absorption zeigt. Beide Pyridinnucleotide weisen jedoch eine auf das Adenin zurückzuführende Lichtabsorption bei $\lambda=260$ nm auf, welche sich beim Hydrierungsvorgang nur gering ändert [v. BRUCHHAUSEN, EBEL, 1993].

COENZYM	λ [NM]	ϵ [1 MOL ⁻¹ CM ⁻¹]
NAD⁺ NADH	260	17,57x10 ³
	260	14,15x10 ³
	334	6,18x10 ³
	340	6,30x10 ³
	365	3,44x10 ³

Tabelle 1 Extinktionskoeffizienten der Nicotinamid-adenin-dinucleotide [ZIEGENHORN, SENN, BÜCHER, 1976]

1.3. BIOCHEMISCHE BEDEUTUNG VON NADH

Die für die vielfältigen Funktionen der Zelle benötigte Energie stammt aus den vom Organismus aufgenommenen Nährstoffen. Diese muss biochemisch in eine zellulär nutzbare Form transferiert werden. Im Rahmen des Zwischenstoffwechsels erfolgt die Gewinnung von Energie durch Umwandlung organischer Stoffe und Aufbau von Adenosintriphosphat (ATP).

Glucose und Fettsäuren stellen hier wichtige Energielieferanten dar. Ihr oxidativer Abbau liefert vor allem den in den Mitochondrien für die Atmungskette und damit für die daran gekoppelte Synthese von ATP erforderlichen Substratwasserstoff in Form von NADH bzw. FADH₂.

Der Substratkatabolismus wird im Wesentlichen in drei große Teilabschnitte unterteilt [ALBERTS et al., 1995].

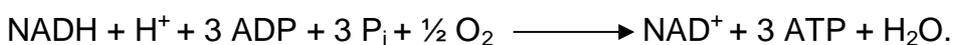
- I. Aufspaltung der makromolekularen Nahrungsbestandteile: Kohlenhydrate zu Glukose, Proteine zu Aminosäuren, Fette zu Fettsäuren und Glycerol.
- II. Umwandlung dieser Bestandteile in Pyruvat und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA).
- III. Vollständige Oxidation von Acetyl-CoA zu H₂O und CO₂ unter gleichzeitiger Bildung von ATP, NADH und Wärme.

In der im Cytosol ablaufenden Glykolyse entsteht zunächst bei aerobem Abbau Pyruvat und hieraus durch oxidative Decarboxylierung Acetyl-CoA. Dieses wird im Citratzyklus weiter zu Kohlendioxid abgebaut und der gewonnene Substratwasserstoff gesammelt. In der Glykolyse wird auch ein geringer Anteil des gesamten ATP durch Substratkettenphosphorylierung erzeugt.

Die erste Stufe des Fettsäureabbaus (die β -Oxidation in den Mitochondrien) liefert Substratwasserstoff und Acetyl-CoA, das, wie oben bereits geschildert, im Citratzyklus weiter zerlegt wird.

Ort des zellulären Energietransfers sind die Mitochondrien, denen somit eine Schlüssel-funktion für die eukaryotische Zelle zukommt.

Dabei beginnt der mitochondriale Elektronentransport im Citratzyklus mit der Gewinnung energiereicher Elektronen. Die eigentliche Atmungskette (Elektronentransportkette) besteht aus vier Multiproteinenzymen. Durch einen fünften Komplex, die ATP-Synthase, wird das oxidative Phosphorylierungssystem vervollständigt. Hier werden über 95 % des körpereigenen ATP gebildet. Die Summenformel der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung lautet:



Im Detail werden in vier Oxidations-Reduktions-Reaktionen drei Elektronenpaare auf die oxidierte Form des NAD^+ und ein Paar auf die oxidierte Form des Flavin-adenin-dinucleotids (FAD^+) übertragen. Diese in ihren reduzierten Formen (NADH und FADH_2) energiereichen Elektronenakzeptoren werden wieder regeneriert, wenn sie ihre Elektronen an die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran weitergeben. NADH gibt seine Elektronen dabei infolge von Zufallszusammenstößen an membran-gebundene Proteine ab. FADH als Bestandteil der inneren Membran gibt seine Elektronen direkt an die Atmungskette weiter. Bei dieser Übertragung verlieren die Elektronen die aufgrund des hohen Redoxpotentials in Bezug auf den molekularen Sauerstoff vorhandene Energie, die nun unter Schaffung eines Protonengradienten die oxidative Phosphorylierung antreiben kann. Bereits 1961 konnte MITCHELL mit ihrer chemo-osmotischen Hypothese die Kopplung von Atmung und ATP-Synthese hinreichend erklären. Sie postulierten, dass die 'Freie Enthalpie des Elektronentransports dadurch gespeichert wird, dass Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transloziert (gepumpt) werden und dadurch ein elektrochemischer Gradient über der inneren Mitochondrienmembran erzeugt wird. Das elektrochemische Potential des Gradienten wird dann zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) herangezogen' [MITCHELL, 1961].

Das oxidative Phosphorylierungssystem setzt sich aus fünf Enzymkomplexen mit mehreren Proteinuntereinheiten zusammen. Dieses Enzymsystem ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die terminalen Reaktionsschritte im sauerstoffabhängigen (aeroben) Energiestoffwechsel. So genannte Reduktions-äquivalente gelangen von NADH , das vor allem im Citratzyklus, bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat und bei der β -Oxidation der Fettsäuren gebildet wird, durch den Komplex I (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase) in den Ubichinon-Pool (Q, QH_2).

Über eine Elektronentransportkette, die aus zwei Transportmolekülen (Ubichinon, QH_2 , und Cytochrom c, Cyt c) sowie den Redox -Zentren der Komplexe I, III (Cytochrom b) und IV (Cytochrom-c-Oxidase) besteht, werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen [DE DUVE, 1992]. So werden die Elektronen im Verlaufe ihrer Transportstrecke entlang der Atmungskette bis zum niedrigsten Energieniveau, d.h. Sauerstoff, heruntertransportiert und geben ihre Energie ab [ALBERTS et al., 1995].

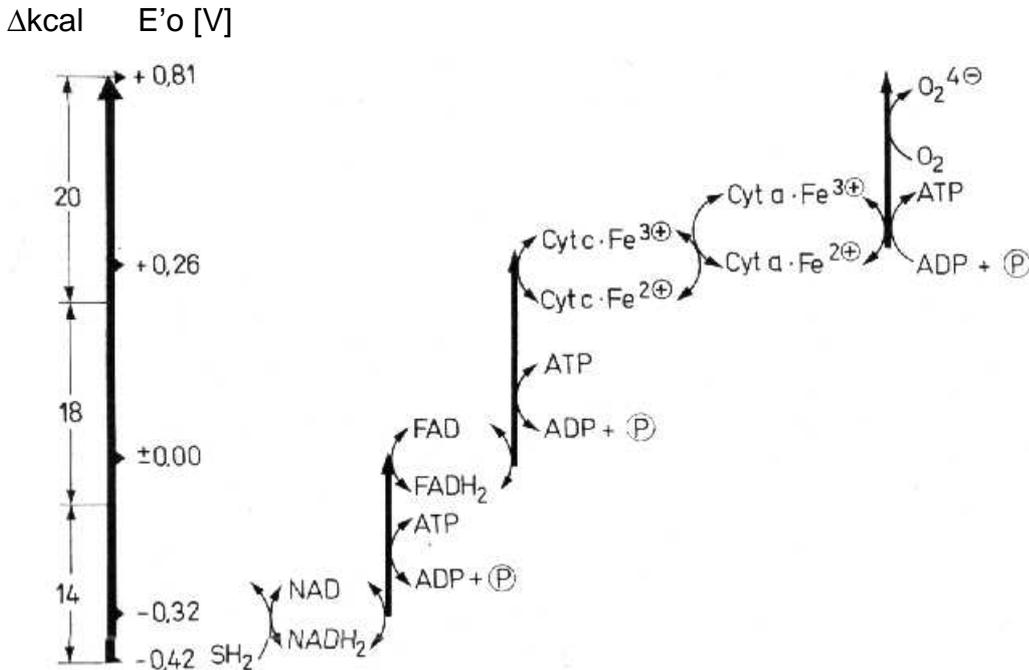


Abbildung 1 Energiefreisetzung innerhalb der Atmungskette [RAPOPORT, 1975]

Sauerstoff reagiert sofort mit dem aus der Gleichgewichtsdissoziation stammenden, ständig vorhandenen H^+ zu Wasser H_2O . Dadurch sinkt die H^+ -Konzentration im Matrix-Raum des Mitochondriums, wodurch die Ausbildung des Gradienten, neben dem oben beschriebenen Mechanismus, zusätzlich verstärkt wird. Die bei dieser kontrollierten Knallgasreaktion freiwerdende Energie wird von Teilen der Atmungskette dazu benutzt, Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien zu transportieren, sodass sich ein Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran ausbilden kann. Der Komplex V (ATP-Synthase) der Atmungskette kann den entstandenen Protonengradienten dazu benutzen, aus ADP und Phosphat ATP zu synthetisieren.

Die Potentialdifferenz in Bezug auf den O_2 beträgt 1,14 V; die freie Energie der Oxidation des NADH durch O_2 entspricht 218 kJ/Mol:



Die Ausbeute an nutzbarer Energie wird gesteigert, indem der Redoxprozess zwischen $NADH/H^+$ und O_2 in einer Serie von Reaktionsschritten zerlegt wird, wobei die Wege für

Wasserstoff und Elektronen getrennt verlaufen. Von den maximal möglichen 218 kJoule werden etwa 130 kJoule als chemische Energie (Freie Energie) in Form von 3 Mol ATP abgefangen (s. o.). Die restliche Energie wird als Körperwärme freigesetzt. Das bedeutet einen Wirkungsgrad von über 60 %.

Unter anaeroben Bedingungen erfolgt hingegen die Fermentation, ein Prozess, bei dem Pyruvat z.B. zu Ethanol und CO₂ bzw. im Skelettmuskel zu Laktat verarbeitet wird. Die Glykolyse ist im anaeroben Medium der zentrale ATP-Lieferant [STRYER, 1988].

1.4. NADH-CHARAKTERISTIK

NAD⁺ sowie dessen reduzierte Form NADH enthalten zwei Nucleotideinheiten, welche jeweils aus stickstoffhaltigen Basen (Nicotinamid und Adenin), D-Ribose und einer Phosphatgruppe bestehen.

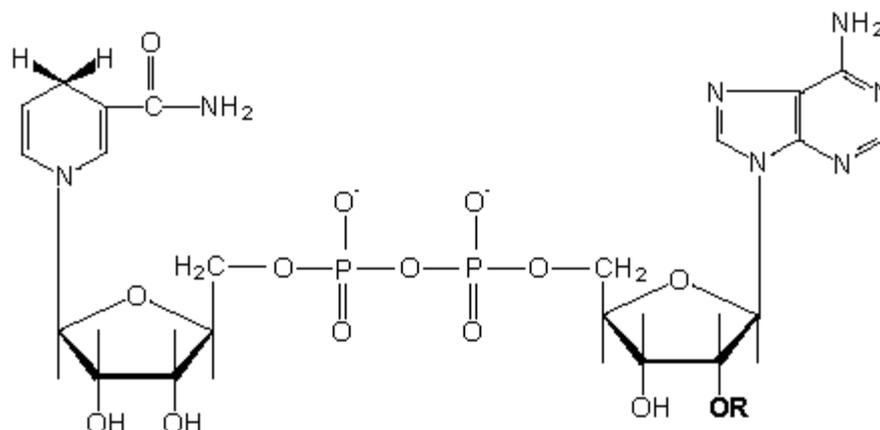


Abbildung 2 Konstitutionsformel Nicotinamid-adenin-dinucleotid

Aus dieser chemischen Struktur resultierte die auf WARBURG und CHRISTIAN zurückzuführende historische Bezeichnung Diphosphopyridinnucleotid (DPN).

Reaktives Zentrum des Nicotinamid-adenin-dinucleotids ist der positiv geladene Pyridinring, der bei biologischen Redoxreaktionen reversibel ein Hydridion aufnimmt.

Adenosin (Adenin + D-Ribose) ist Bestandteil mehrerer biologisch aktiver Verbindungen, wie z.B. der energiereichen Phosphate Adenosin-5-triphosphat (ATP) und Adenosin-5-diphosphat (ADP), des Adenosinmonophosphates (AMP) und der Nukleinsäuren.

Während die N-glykosidische Bindung im Fall des Adenosin-5-phosphates stets in β -Position vorliegt, besteht zwischen Nicotinamid und Ribose-5-phosphat die Möglichkeit der α - oder β -glykosidischen Verknüpfung. Demzufolge kann Nicotinamid-adenin-dinucleotid in einer α - und β -Form vorliegen.

Nur β -NAD⁺ und β -NADH sind als Coenzyme aktiv [v. BRUCHHAUSEN, EBEL, 1993].

1.5. FLUORESZENZ

Fluoreszenz ist die relativ rasch abklingende Lichtemission durch Atome oder Moleküle, die durch Absorption energiereicher Strahlen angeregt werden. Diese Absorption erfolgt durch die Elektronenhülle der Moleküle. Dadurch gehen die Moleküle von einem energetischen Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 oder S_2 über.

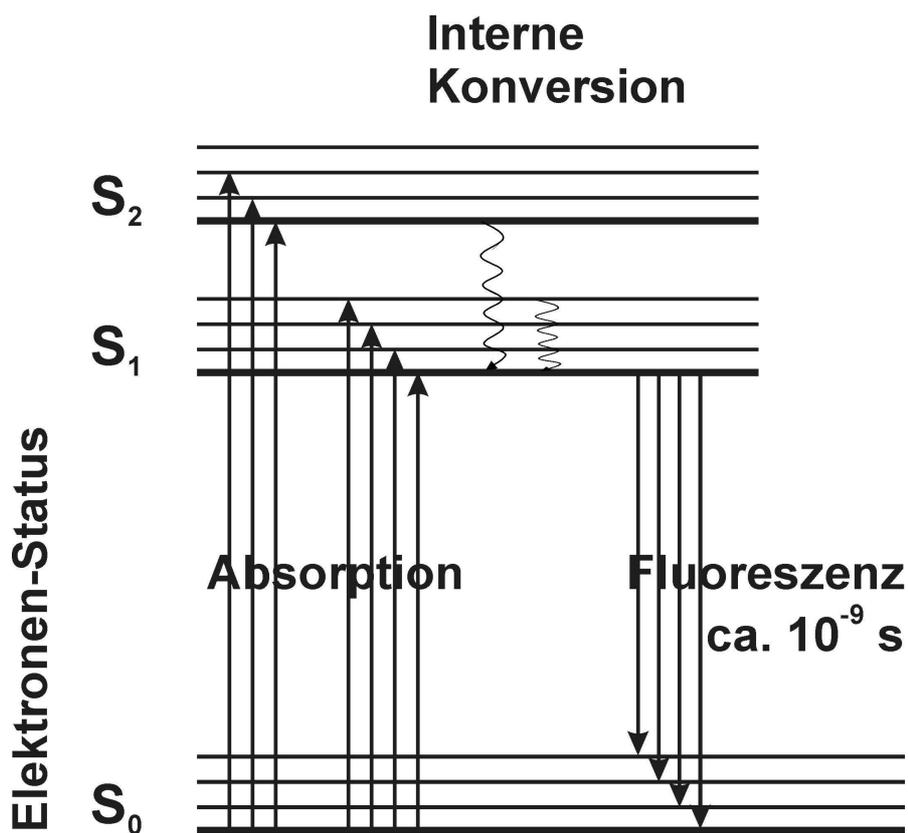


Abbildung 3 Jablonski - Diagramm zur Darstellung der unterschiedlichen Energieniveaus

Der Absorptionskoeffizient ist dabei wellenlängenabhängig. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zerfällt der angeregte Zustand nun wieder unter Abstrahlung eines Photons (Fluoreszenz). Findet die Anregung durch einen Laser statt, so spricht man hierbei von Laser-induzierter Fluoreszenz [HOLLAS, 1995].

Ein LASER (light amplification by stimulated emission of radiation) stellt eine Lichtquelle dar, die sich dadurch auszeichnet, dass sie fast monochromatisches Licht mit geringer räumlicher Divergenz aussendet. Die Anwendung eines Lasers bietet u. a. folgende Vorteile: die kurze Laserpulsdauer und kleine spektrale Breite der Laserstrahlung ermöglichen eine genaue zeitliche und spektrale Anregung von Molekülen; aufgrund der exakten Fokussierbarkeit der Laserstrahlung ergibt sich zudem eine gute räumliche Eingrenzung des angeregten Areal.

Zell / Gewebe-Fluoreszenz kann durch exogene – applizierte – Fluorophore (Xenofluoreszenz) oder durch endogene – körpereigene – Fluorophore (Autofluoreszenz) bei geeigneter Bestrahlung induziert werden. Fluoreszenzfarbstoffe hoher Selektivität und hoher Fluoreszenzquantenausbeute stehen z.B. für die Untersuchung vitaler Zellen zur Verfügung (z.B. Rhodamin 123: Mitochondrien-Marker, Acridin Orange: DNS-Schädigungs-Marker, Propidiumjodid: Todzell-Indikator, Fura-2: Kalzium-Indikator, FITC: Antigen/Antikörper-Marker) [FINK et al., 1993].

Die schwache Fluoreszenz des Photosensibilisators HpD (wie zum Beispiel Photofrin I, einem komplexen lipophilen Porphyringemisch) kann aufgrund der tumorselektiven Anlagerung für eine Tumorkalisation genutzt werden.

Wichtige endogene Fluorophore sind Tryptophan, NADH, NADPH und Flavine sowie zinkhaltige und metallfreie Porphyrine.

NADH kommt intrazellulär sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vor. Im Extrazellulärraum konnten keine NADH-Fluoreszenzen nachgewiesen werden [MOTTIN et al., 1997].

Die NADH/NADPH-Fluoreszenz kann als sensitiver Bioindikator für den Zellmetabolismus, den intrazellulären Redoxzustand, Sauerstoffmangel und Störungen in der Atmungskette genutzt werden. Ein Anstieg der NADH-Fluoreszenz weist auf eine verminderte Gewebeaktivität mit reduziertem NADH-Verbrauch hin [DORA et al., 1984], ein Abfall der intrazellulären NADH-Fluoreszenz auf einen Anstieg der metabolischen Aktivität [MAYEVSKI et al., 1996].

NADH-Fluoreszenz kann ebenfalls bei der Tumorlokalisation Anwendung finden. Neoplastisches Gewebe zeigt im Vergleich zu gesunden Zellen eine deutlich höhere metabolische Aktivität mit gesteigertem NADH –Verbrauch. Tumorgewebe weist somit im Vergleich zu gesundem Zellen eine erniedrigte Fluoreszenzintensität auf [KÖNIG, 1995; LOHMANN et al., 1989].

Im Vollblut lässt sich NADH ausschließlich innerhalb korpuskulärer Bestandteile (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) nachweisen [KLINGENBERG, 1994].

Das Fluoreszenzverhalten von NADH ist maßgeblich durch die Bindung an ein Protein beeinflusst. So reagiert NADH auf die Anbindung an ein Enzym mit einer deutlichen Vergrößerung der Fluoreszenzquantenausbeute, der Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu kürzeren Wellenlängen und einer Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer von 400 ps in wässriger Lösung auf etwa 2 ns im gekoppelten Zustand [LAKOWICZ et al., 1992].

Durch Messung der Fluoreszenz(de)polarisation kann somit bestimmt werden, ob NADH an ein Protein oder eine Membran gebunden ist, bzw. frei vorliegt [SCHMIDT, 1994].

Intramitochondriales NADH, welches fast ausschließlich in proteingebundener Form vorliegt, emittiert ein doppelt so starkes Fluoreszenzsignal wie das vorwiegend ungebundene zytoplasmatische NADH.

Beobachtungen sprechen dafür, dass im Intrazellulärraum die mitochondriale NADH Fraktion quantitativ überwiegt. Bei Versuchen mit einer erhöhten intramitochondrialen NADH Konzentration zeigte sich eine messbare Fluoreszenzzunahme, hingegen konnte eine Fluoreszenzabnahme bei erhöhten intramitochondrialen NAD⁺ Konzentrationen belegt werden [JÖPSIS et al., 1970].

Untermauert wird dieses durch Untersuchungen des Zellstoffwechsels. Natriumcyanid, Chloramphenicol und Amytal als Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung verursachen eine Zunahme der NADH Fluoreszenz. 2,4 Dinitrophenol als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung bewirkt eine Abnahme der NADH Fluoreszenz [RIEPE et al., 1996; REX et al., 1999; MOTTIN et al., 2003].

Es ist somit davon auszugehen, dass die ermittelten NADH Fluoreszenzsignale in erster Linie die intramitochondriale NADH Konzentration reflektiert.

Da die NADH-Fluoreszenz nur von der Nicotinsäureamidgruppe ausgeht, hat die Anwesenheit der PO_3 -Gruppe beim NADPH keinen Einfluss auf die Fluoreszenz. Folglich wird bei fluorometrischen Messungen mit den o. g. Wellenlängen neben NADH auch seine phosphorylierte Form, das NADPH erfasst. Die Konzentration von NADPH steht in Säugerzellen im Vergleich zur NADH-Konzentration im Verhältnis 1:92, sodass dieser Anteil zu vernachlässigen ist [OMACHI, 1969].

1.6. KLINISCH-CHEMISCHE ANALYSEN MIT NADH

Die meisten quantitativen Bestimmungsmethoden der klinisch-chemischen Analyse beruhen auf photometrischen Messungen. Sie werden u. a. zur Untersuchung von Blut und Blutserum, zur Prüfung der Leberfunktion, der Nierenfunktion und der Darmresorption sowie zur Analyse von Harn, Punktionsflüssigkeiten, Magensaft, Sputum und Stuhl eingesetzt [MICHAL, 1973].

Das NADH-Verfahren, auch als „Optischer Test“ nach OTTO WARBURG oder „UV-Test“ bezeichnet, findet hier Anwendung zur Bestimmung von Substanzen in Blut, Serum und Urin sowie zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen. Die spezifische Lichtabsorption der Pyridinnucleotide lässt sich zur Konzentrationsbestimmung von Substraten, Enzymen und der Pyridinnucleotide selbst verwenden [RAPOPORT, 1975].

Wie bereits dargestellt, besitzt NADH ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei $\lambda=340$ nm, während NAD^+ nur ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=260$ nm aufweist. Daher kann der Verbrauch bzw. die Bildung von NADH photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=340$ nm kontrolliert werden.

Zur Bestimmung von Substraten werden der Probe die entsprechenden Enzyme einschließlich NADH bzw. NAD^+ im Überschuss zugesetzt. Die Änderung der NADH-Absorption bei $\lambda=340$ nm führt zu einem konstanten Endwert, aus dem die Substratkonzentration ermittelt wird (Endwertmethode). Innerhalb gewisser Grenzen lassen sich auch Substrate kinetisch messen. Dazu werden die Bedingungen derart gewählt, dass das zu bestimmende Substrat in der Reaktion begrenzend ist. Somit ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratkonzentration proportional [RAPOPORT, 1975].

Das NADH-Verfahren zeichnet sich durch eine weitgehende Spezifität, hohe Empfindlichkeit und große Schnelligkeit aus.

Von einem gekoppelten optischen Test spricht man dann, wenn an der Reaktion selbst kein NAD^+ beteiligt ist, sondern erst in einer Folgereaktion verbraucht wird bzw. entsteht.

Bei der Messung der Alaninaminotransferase (ALAT) entsteht Pyruvat. Pyruvat wird durch NADH in einer LDH- katalysierten Reaktion zu Laktat und NAD^+ reduziert. Wählt man nun die Reaktionsbedingungen so, dass das entstehende Pyruvat rasch und vollständig in Laktat umgesetzt wird, kann man aus der Geschwindigkeit, mit der NAD^+ entsteht, indirekt auf die ALAT-Aktivität schließen.

1.7. NADH-BESTIMMUNGSMETHODEN

1. Spektrophotometrische Bestimmung

Bei diesem enzymatischen Verfahren erfolgt die Bestimmung von NADH mittel eines Spektralphotometers im alkalischen, nach Neutralisation gepufferten Gewebeextrakt. Prinzipiell kann hier jede NAD-spezifische Dehydrogenasereaktion Verwendung finden. Gebräuchlich ist beispielsweise die durch Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GDH) katalysierte Oxidation von NADH durch Dihydroxyacetonphosphat (DAP). Bei einer Messstrahlung von $\lambda=340$ nm (bei Hg-Lampen $\lambda=334$ nm) erfolgt die Messung des Probeextraktes gegen eine Vergleichküvette mit verdünnter Kaliumdichromat-Lösung. Rechnerisch erhält man die NADH-Menge pro Volumeneinheit des Untersuchungsmaterials [BERGMEYER, 1974].

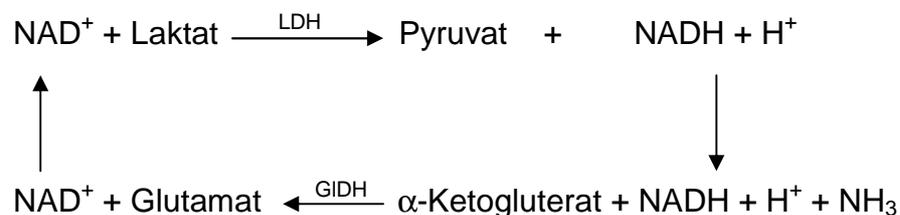
2. Fluorimetrische Bestimmung

Bei der fluorimetrischen Bestimmung wird die Eigenfluoreszenz von NADH und NADPH genutzt. Aus dem von einer Quecksilber- oder Xenonlampe ausgehenden Licht wird durch einen Filter oder Monochromator eine Wellenlänge um 340 nm genutzt. Das Licht dieser Wellenlänge durchstrahlt die Probe, welche daraufhin zur Fluoreszenz angeregt wird. Aus dem abgestrahlten Fluoreszenzlicht wird ebenfalls durch einen Filter oder Monochromator ein Wellenlängenbereich um 450 nm selektiert und dessen Intensität gemessen.

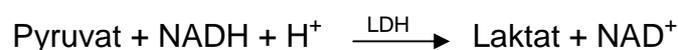
Fluorimetrische Bestimmungsmethoden nutzen den gleichen o. g. Gewebeextrakt, sind jedoch bei geeignetem Fluorimeter empfindlicher und somit bei geringeren Mengen Untersuchungsmaterial verwendbar als spektrophotometrische Methoden. Ihr Nachteil ist das Ablesen in willkürlichen Einheiten, die stets durch Zusatz einer NADH-Lösung zum Extrakt geeicht werden müssen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Fluoreszenzausbeute durch die verschiedenen gelösten Substanzen des Extraktes stark beeinflusst wird [BERGMEYER, 1974].

3. Bestimmung durch ‚enzymatic cycling‘

In diesen Reaktionen wirken die Nukleotide als Katalysatoren einer enzymatischen Dismutation zwischen zwei Substraten. Die Nukleotidkonzentrationen sind dabei weit unterhalb ihrer K_M -Werte. Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind proportional der Nukleotidkonzentration. Nach einigen Tausend Zyklen wird eines der Produkte gemessen. Zur NADH-Bestimmung wird hierbei meist die Laktat- und Glutamatdehydrogenase genutzt:



Die im dargestellten Zyklus entstandene Menge an Pyruvat ist proportional der Pyridin-nukleotid-Konzentration. Pyruvat wird nach der Gleichung:



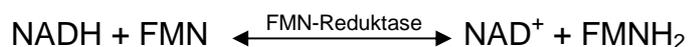
fluorimetrisch gemessen. Es werden Filterfluorimeter mit Primärfilter für Anregungsstrahlung bei 360 nm und Sekundärfilter für austretendes Licht von etwa 460 nm verwendet. Zu jeder Messreihe müssen NAD- und NADH-Standardwerte mit analysiert werden [BERGMEYER, 1974].

4. Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Eine weitere Bestimmungsmethode der Pyridindinucleotide ist die mittels HPLC. Durch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie lassen sich sensitiv NADP^+ , NADPH , NAD^+ als auch NADH nachweisen. Eine Reaktion der oxidierten Nucleotide unter Zusatz von Zyanid in einer basischen Lösung bildet dauerhaft fluoreszierende Produkte (NAD-CN , NADP-CN). Eine Bestimmung aller vier Nucleotide in einem Chromatogramm ist hierbei mit ca. 10 mg Probenmaterial möglich. Diese Methode eignet sich somit auch für den Nachweis der Pyridindinucleotide in unterschiedlichen ZNS-Regionen von Nagern [KLAIDMAN et al., 1995]. Sie findet ebenfalls Anwendung bei der Bestimmung der Resorptionsquoten *in vitro* [KAPPES et al., 2005].

5. Luminometrische Verfahren

Hierbei wird in einer ersten enzymatischen Reaktion NADH oxidiert und Flavinmononucleotid (FMN) reduziert.



Anschließend wird die reduzierte Form des FMN, das FMNH_2 reoxidiert, wobei ein langkettiges Aldehyd (R-CHO) reduziert wird. Als Enzym dient Luciferase.



Die Intensität des dabei freiwerdenden Lichtes ist, wenn die anderen Reaktionspartner im Überschuss vorliegen, proportional zur NADH -Konzentration und kann in einem Luminometer erfasst werden.

6. Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie (engl.: Nuclear Magnetic Resonance oder abgekürzt NMR) ist eine Methode zur Strukturaufklärung organischer oder anorganischer Verbindungen, die Atomkerne mit einem magnetischen Moment enthalten. Atomkerne mit magnetischem Moment sind z.B. die Isotope ^1H , ^{13}C , ^{31}P oder ^{19}F . Die Standardmethode ist die so genannte hoch aufgelöste NMR Spektroskopie. Hier werden Proben

(einige μg oder mg) aufgelöst und in ein starkes Magnetfeld gebracht. Die magnetisch aktiven Kerne richten sich aus und nehmen verschiedene Energieniveaus ein, die sich um gequantelte Energiebeträge unterscheiden.

Diese Energiebeträge werden durch Hochfrequenzspulen in Form von elektromagnetischen Wellen im MHz-Bereich eingestrahlt.

Die Anregung erfolgt durch einen kurzen Radiofrequenzimpuls. Hochfrequenzspulen registrieren das Antwortsignal; nach Digitalisierung und Fouriertransformation erhält man ein so genanntes Spektrum. Dies ist eine Art Fingerabdruck der Moleküle in der Probe.

Mit dieser Messmethode lassen sich Struktur und Konzentration einzelner Moleküle oder Molekülgemische bestimmen. Diese Strukturaufklärung ermöglicht u. a. die Bestimmung von NADH in der präparativen Chemie sowie der Biochemie [FRIEBOLIN, 1999].

7. Bestimmung mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie

Die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie bietet die Möglichkeit, Fluoreszenz zuverlässig und schnell zu detektieren und auf diese Weise NADH in Zellen und Zellverbänden auch *in vivo* zu bestimmen.

Die Laserimpulse geringer Leistung greifen nicht in die Funktion des Biosystems der Zellen ein. Die verwendeten Lichtimpulse regen allerdings nicht nur die Fluoreszenz der NADH-Moleküle, sondern auch die anderer physiologisch im Gewebe vorkommender Fluorophore z.B. Riboflavine (FMN und FAD), NADPH, aromatische Aminosäuren, Kollagen und Elastin sowie Pyridoxal-Derivate an.

Die quantitativ überwiegenden Fluorophore im tierischen Gewebe sind NADH und Flavine [Lakowicz, 1999]. NADPH kommt im Kortex nur in geringen Mengen vor [KLAIDMAN et al., 1995]. Eine Differenzierung der Fluoreszenzstrahlung von NADH und Flavinen ist gut möglich, da sich – wie in Tabelle 2 ersichtlich – charakteristische Parameter wie Emissionsmaximum und Fluoreszenzlebensdauer deutlich unterscheiden [Lakowicz, 1999].

MOLEKÜL	ABSORPTIONSMAXIMUM	EMISSIONSMAXIMUM	FLUORESCENZLEBENSDAUER (IN WASSER)
NADH	339 nm	465 nm	0,4 ns
FAD	375, 450 nm	535 nm	3,5 ns
FMN	375, 450 nm	535 nm	5,3 ns
Riboflavin	375, 450 nm	535 nm	4,6 ns
Kollagen	300-340 nm	~380 nm	2-3 ns
Elastin	300-340 nm	420-460 nm	2 ns; 6,7 ns
Keratin	<300 nm	410-420 nm	0,4 ns; 5,1 ns

Tabelle 2 Charakterisierung der wichtigsten, im menschlichen Gewebe vorkommenden Fluorophore

NAD weist nur ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 260$ nm auf. Im Unterschied hierzu besitzt NADH ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei $\lambda = 340$ nm.

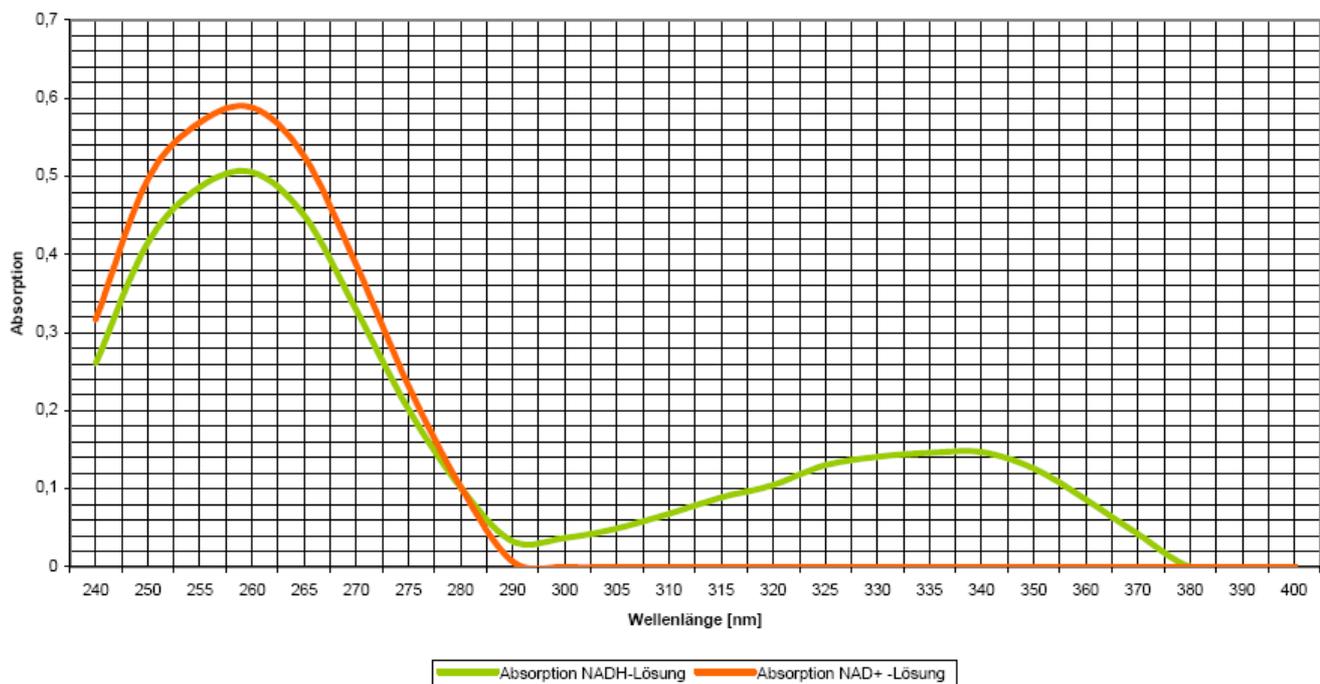


Abbildung 4 Absorptionsspektren von NADH und NAD⁺

Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von 340 nm erzeugt selektiv NADH-typische Fluoreszenzsignale mit einem Maximum bei 465 nm.

Durch die gleichzeitige Verwendung eines spektralen und eines zeitlichen Filters kann so die laserinduzierte NADH-Fluoreszenz von der anderer Moleküle unterschieden werden [BEUTHAN et al., 1990; FINK et al., 1993; PFEIFER et al., 1996].

Die Nutzung eines Stickstofflasers zur Fluoreszenzanregung erlaubt die Verwendung äußerst feiner, in unserem Falle jeweils 100 µm starker Glasfasersonden.

Zur Anregung der NADH-Fluoreszenz werden kurze Lichtimpulse (0,1 ns) eines Stickstofflasers mit einer Impulsleistung <10 mW verwendet. Der durch den Laser erzeugte Lichtimpuls ist kürzer als die Abklingphase der NADH-Fluoreszenz (5×10^{-10} Sekunden). Dadurch existiert ein kurzes zeitliches Fenster, in dem die Fluoreszenz ohne Störung durch die Streustrahlung des Anregungslichtes messbar ist. Die Anwendung eines entsprechenden, o. g. zeitlichen Filters, ermöglicht somit eine kontinuierliche (online-) Fluoreszenzmessung der angeregten NADH-Moleküle.

Über eine 100 µm starke Glasfasersonde werden die Lichtimpulse des Stickstofflasers in die zu untersuchende Geweberegion geleitet. Die entstandene Fluoreszenz sowie das Streulicht werden über eine zweite, ebenfalls 100 µm starke Glasfaser zurück zum Fluoreszenzdetektor geleitet.

1.8. NADH IN DER PATHOGENESE UND THERAPIE – VERMUTETE KLINISCHE WIRKUNGEN

Wie bereits im Abschnitt 1.3 Biochemische Bedeutung von NADH dargestellt, existiert eine enge Korrelation zwischen Energiestoffwechsel und NADH-Konzentration einer Zelle. Metabolische und neuronale Dysfunktionen können sich somit auch in Änderungen der NADH-Konzentration widerspiegeln. Hieraus erwächst das weite Forschungsfeld klinischer Möglichkeiten von extern appliziertem NADH.

1.8.1. NADH UND DAS PARKINSON-SYNDROM

Das Parkinson-Syndrom ist die häufigste neurologische Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters (ca. 1% der über 60jährigen). Männer sind dabei deutlich häufiger betroffen als Frauen. Das Parkinson-Syndrom tritt überwiegend spontan auf und ist nur selten auf erbliche Faktoren oder Einwirkung von Umweltgiften wie z.B. Kohlenmonoxid, Mangan und MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) zurückzuführen [ORTH et al., 2002]. Infolge einer Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra, welche hemmend auf cholinerge Neurone im Corpus striatum einwirken, entwickelt sich ein extrapyramidales Syndrom mit dem Überwiegen cholinergischer Reaktionen. Leit-symptome sind der (nicht obligate) Trias: Tremor, Rigor und Hypokinese.

Biochemisch liegt offenbar eine Funktionsstörung des Komplex I der Elektronentransportkette der Neuronen der Substantia nigra, ggf. aber auch anderer Strukturen (Skelettmuskel und Thrombozyten) und Enzymkomplexe der Atmungskette (II und III) vor [ORTH et al., 2002].

Die biochemische Ursache der motorischen Einschränkungen bei Parkinsonpatienten liegt im Mangel des Neurotransmitters Dopamin in den Basalganglien. Die direkte Vorstufe von Dopamin ist L-DOPA. Studien zeigten, dass beim Parkinsonismus das L-DOPA produzierende Enzym Tyrosinhydroxylase in der Substantia nigra vermindert ist [MCGEER et al., 1971]. Eine vermehrte Aktivität der Tyrosinhydroxylase könnte somit zu einer erhöhten Bereitstellung von Dopamin führen. Zur Stimulation der Tyrosinhydroxylase wurde das Coenzym Tetrahydrobiopterin, welches jedoch nicht die Blut/Hirnschranke passieren kann, erwogen [NAGATSU et al., 1984]. Es konnte gezeigt werden, dass über die Vorstufe Dihydrobiopterin die Aktivierung von Tetrahydrobiopterin und letztlich der Anstieg der endogenen L-DOPA-Synthese erreicht werden kann. NADH ist das Coenzym der Dihydropteridinreduktase, des Enzyms, welches zur Umwandlung von Dihydrobiopterin zu Tetrahydrobiopterin benötigt wird [NICHOL et al., 1985].

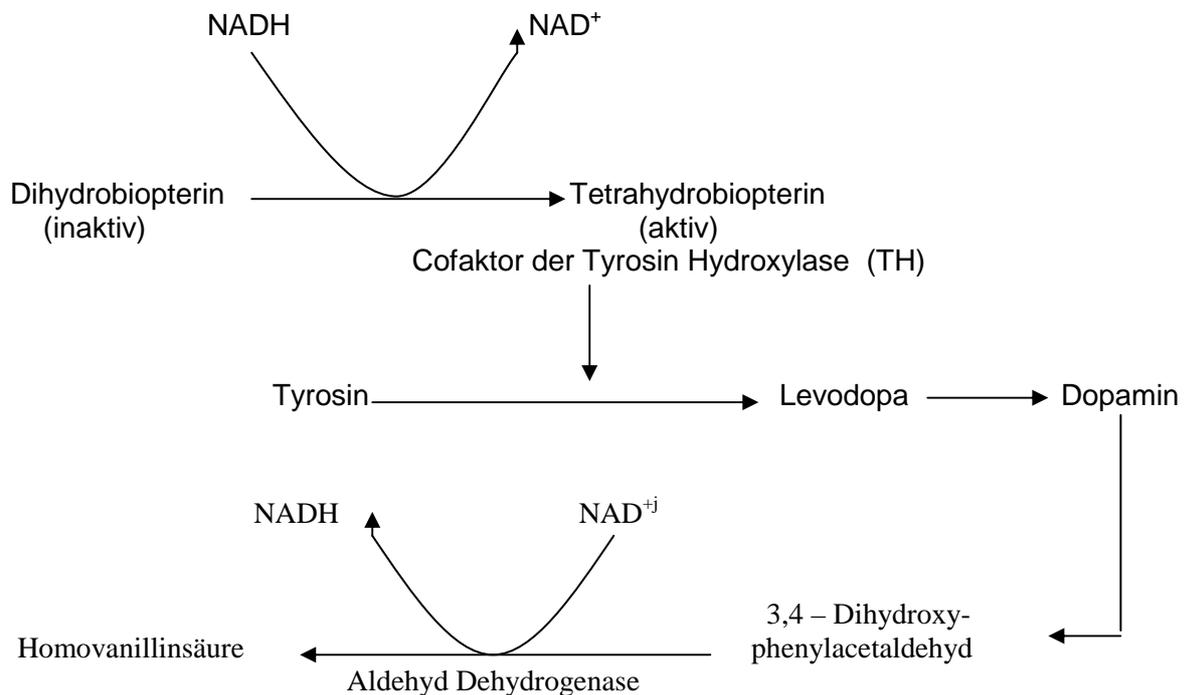


Abbildung 5 Die Rolle von NADH bei Synthese und Abbau des Neurotransmitters Dopamin

Somit sollte die vermehrte Zufuhr von NADH zu einer gesteigerten Dopaminsynthese führen.

Auf dieser Grundlage wurden zwischen Oktober 1987 und Dezember 1988 161 Parkinsonpatienten im Rahmen einer offenen Studie mit β -NADH-Infusionen behandelt. Bei 71,4% der Patienten konnte eine deutliche Verbesserung der Symptomatik verzeichnet werden. 17,4% zeigten unter dieser Therapie einen mäßigen, 11,2% keinen Erfolg [BIRKMAYER et al., 1989].

Auf die Ergebnisse u. a. dieser Studien [BIRKMAYER et al., 1990; VRECKO et al., 1993] aufbauend, erschien 1993 eine weitere Untersuchung mit 885 beteiligten Patienten. 415 Patienten wurde NADH intravenös, 470 oral verabreicht.

Verifiziert an einem definierten Score zeigten 19,3% der Patienten eine 30-50%ige Verbesserung ihrer Symptomatik, 58,8% der Patienten eine mäßige, also 10-30%ige Besserung ihrer Beschwerden. 21,8% der teilnehmenden Patienten sprachen auf die

Therapie nicht an. Die Ergebnisse nach oraler Gabe unterschieden sich hierbei nicht signifikant von denen nach intravenöser Verabreichung [BIRKMAYER et al., 1993].

1.8.2. NADH UND DNA-REPARATUR

Doxorubicin (Adriamycin) wird als Zytostatikum z.B. bei Mamma- und Endometriumkarzinomen, Lymphomen und bei der akuten lymphatischen Leukämie verwendet. Zytostatika verhindern bzw. verzögern die Zellteilung aktiver Zellen durch unterschiedliche Beeinflussung ihres Stoffwechsels und führen somit zu Zellschädigungen.

Eine 1998 von ZHANG et al. veröffentlichte Studie beschreibt die Unterschiede der durch Doxorubicin verursachten DNA-Schädigungen an Phäochromozytomzellen der Ratte (PC-12) unter Beteiligung und bei Abwesenheit von NADH. Die Arbeit zeigt, dass NADH nicht nur die Widerstandsfähigkeit der PC-12-Zellen gegenüber einer durch Doxorubicin induzierten DNA-Schäden erhöht, sondern auch DNA-Reparaturprozesse in diesen Zellen fördert.

ZHANG et al. schlossen daraus, dass NADH mit dem Zytostatikum gegeben, durch Stimulation des DNA-Reparatursystems und Förderung der normalen Zellbiosynthese nach Chemotherapie, als Schutz gesunder Zellen fungieren kann.

1999 veröffentlichte eine Wissenschaftlergruppe um SLADE eine Untersuchung über die Wirkung von NADH auf die Tumorzellproliferation an murinen Fibrosarkom- und humanen Kehlkopfkarcinom Zelllinien. Es zeigte sich unter Einfluss von NADH eine deutliche antiproliferative Wirkung von bis zu 88% einer Larynxkarzinom-Zelllinie (Hep-2) im Vergleich zu Kontrollgruppen mit einer Proliferationsrate von 100%.

Andere Tumorzelllinien wie Kolonkarzinom, Mammakarzinom oder Zervixkarzinom sprachen auf NADH nicht an.

1.8.3. NADH UND APOPTOSE

Mitochondrien sind als die ATP-produzierenden Zellorganellen der Eukaryonten von zentraler Bedeutung für die meisten Leistungen nahezu aller Zellen des Organismus. Eine Schädigung der Mitochondrien ist mit Apoptose, den durch genetische Informationen der betroffenen Zelle selbst regulierten Zelluntergang verbunden.

So z.B. bewirken Zytostatika nicht nur die Zerstörung von Tumorzellen, sondern führen auch zur Apoptose von gesundem Gewebe.

Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Depletion der NAD⁺ und ATP -Speicher. DNS -Schädigungen bewirken eine Aktivierung des Enzyms poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP). NAD⁺ fungiert als Substrat. Es resultiert eine enge Beziehung zwischen NAD⁺ Konzentrationen, PARP -Aktivität und DNS Reparatur [SATOH et al., 1993].

XU und Mitarbeiter zeigten in einer im Jahr 2000 veröffentlichten Arbeit an gesunden Zellkulturen die Reduzierung von Zytostatikanebenwirkungen sowie des Schutzes vor Apoptose bei Zusatz von NADH zu appliziertem Cisplatin [XU et al., 2000].

Im Rahmen weiterer Arbeit konnte dargestellt werden, dass 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) bei Mäusen den Untergang dopaminergener Neurone mit Retardierung von kognitiven Fähigkeiten bewirkt. Bei Applikation von Nicotinamid zeigten sich deutlich weniger Defizite. Nicotinamid bewies so seine neuroprotektive Wirkung durch Hemmung von PARP [YANG et al., 2004].

1.8.4. NADH UND DEPRESSION

Antidepressiv wirkende Medikamente wie z.B. die trizyklischen und tetrazyklischen Antidepressiva, die Selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), die Hemmer der Monoamin-Oxidase (MAO-Hemmer) und die Selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) sind in der Therapie des depressiven Syndroms etabliert.

NADH soll seinerseits die endogene Biosynthese der bei depressiven Patienten vermindert vorkommenden Neurotransmitter Dopamin und Noradrenalin stimulieren (Wirkungsmechanismen siehe 1.8.1. NADH und das Parkinson-Syndrom).

In einer 1991 veröffentlichten offenen Studie wurden 15 Patienten mit Depression zwischen 2 und 12 Wochen mit oral, intramuskulär oder intravenös appliziertem NADH behandelt. Bei allen 15 Patienten wurden anhand eines 80 Fragen umfassenden Scores eine Verbesserung der klinischen Symptomatik zwischen 63 und 96%, verglichen mit der Eingangsbewertung, verzeichnet [BIRKMAYER et al., 1991].

Im Rahmen von tierexperimentellen Untersuchungen konnte eine antidepressive Wirkung von NADH an Ratten im Forced Swim Test - einem vielfach zu diesem Zweck eingesetzten Test [PORSOLT et al., 1977; CRYAN et al., 2002] - bestätigt werden. Ähnlich

dem Fluoxetin führte NADH hier zu einem verlängerten Schwimmverhalten der Ratten [REX et al., 2004].

1.8.5. NADH UND BLUTDRUCKREGULATION

Die Hypertonie mit einer Prävalenz von ca. 10–30% und die hieraus entstehenden Krankheitsbilder wie z.B. der apoplektische Insult oder die koronare Herzkrankheit stellt eine Haupttodesursache in der heutigen Industriegesellschaft dar.

1998 veröffentlichten BUSHERI et al. eine Untersuchung zum Einfluss von oral appliziertem β -NADH auf den Blutdruck von spontan hypertensiven Ratten (SHR). In einer placebokontrollierten Studie erhielten 10 SHR Placebo und 10 SHR NADH über jeweils 10 Wochen. Am Ende der Untersuchung wies die Gruppe der NADH-therapierten SHR einen durchschnittlichen systolischen RR von 184 mm Hg im Unterschied zur Kontrollgruppe mit 201 mm Hg auf. Ebenso konnte unter NADH-Gabe der Gesamtcholesterin- und LDL-Spiegel im Vergleich zur Placebogruppe gesenkt werden [BUSHERI et al., 1998]. Die Mechanismen hierfür sind bis dato noch weitestgehend ungeklärt.

1.8.6. NADH UND CHRONISCHES ERMÜDUNGSSYNDROM

Das Chronic fatigue syndrome (CFS) oder Chronisches Ermüdungssyndrom ist ein Krankheitsbild unbekannter Ätiologie und Pathogenese. Infektionen, Immundefekte, hormonelle Dysregulationen sowie psychosomatische oder psychosoziale Störungen werden diskutiert.

Das Hauptmerkmal des CFS ist ein über mindestens sechs Monate persistierendes Gefühl schwerer Erschöpfung ohne erkennbare Ursache, die mit einer nachhaltigen Verminderung der gewohnten privaten und beruflichen Aktivität einhergeht. Hinzu kommt eine Reihe somatopsychischer Begleitsymptome wie allgemeines Schwächegefühl, Unwohlsein, Myalgien, Fiebergefühl, schmerzhafte Lymphknoten, Durchfall, Übelkeit, Depressionen, Erinnerungsstörungen und eine eingeschränkte intellektuelle Leistungsfähigkeit. Objektivierbare physikalische Parameter oder spezifische Labor-

parameter, die pathognomonisch für eine CFS wären, wurden bislang nicht gefunden [LAWRIE et al., 1997].

Die Angaben zur Prävalenz der CFS variieren je nach Autor zwischen 3,4 und 2600 Fällen pro 100.000 Einwohner. In den modernen Industriestaaten geben ca. 3-4 % der Bevölkerung das Symptom einer chronischen Müdigkeit an [WESSLEY et al., 1997].

Der Nachweis für die Wirksamkeit einer spezifischen Therapie konnte bislang nicht erbracht werden. Eine Vielzahl von Therapieversuchen mit differenten und zum Teil sehr kostenintensiven Medikamenten (Immunglobuline, Virostatika, Interferon, unspezifische Immunstimulantien u. a.) oder mit paramedizinischen Verfahren (Ozontherapie, „ionischer Sauerstoff“ u. a.) blieben ohne objektivierbare Erfolge [JASON et al., 1999].

26 Patienten wurden im Rahmen einer randomisierten Doppelblind-Crossover-Pilotstudie über 12 Wochen mit oral applizierbaren NADH therapiert. Bei 8 von 26 Patienten (31%) wurde unter der Anwendung von NADH eine Besserung ihrer Symptomatik beschrieben, wogegen dieses bei der Gabe von Placebo nur bei 2 von 26 Patienten (8%) geschildert wurde [FORSYTH et al., 1999].

1.8.7. NADH UND MUSKELLEISTUNG

Den Tatsachen folgend, dass NADH biologisch unverzichtbar für die ATP-Produktion und Zellregulation, die DNA-Reparatur, das zelluläre Immunsystem und die antioxidative Regulation ist, veröffentlichte im November 2000 eine Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Freiburg eine placebo-kontrollierte Cross-over-Studie mit Untersuchungen an 14 Ausdauersportlern. Mit der Vorstellung, dass die zelluläre Leistungsfähigkeit und die zellspezifische Kompetenz mit dem Gehalt an NADH korrelieren, wurde über jeweils 4 Wochen stabilisiertes, reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid oral appliziert.

Über Parameter der muskulären Leistungsfähigkeit und systemischen Stressregulation zeigten sich unter NADH-Substitution u. a. eine Reduzierung des O₂-Verbrauches und eine Verbesserung der O₂-Utilisation. Diese Zunahme der aeroben Arbeitsökonomie unter Körperarbeit wird möglicherweise über eine vermehrte zelluläre Verfügbarkeit von NADH und ein auf diesem Weg erhöhtes Angebot an ATP erreicht. Diese Studie

verstand sich allerdings nur als Grundlage für weiterführende Untersuchungen [GRATHWOHL et al., 2000].

1.8.8. NADH UND WELLNESS-DRUGS

Lifestyle- und Wellness-Medikamente haben in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Sie stellen, wie der Name besagt, pharmazeutische Produkte dar, die zum Ziel haben, die Lebensqualität zu ändern, vornehmlich zu verbessern. Auf der Suche nach Jugend, bei Problemen wie Impotenz, Adipositas, Alltagsdepressionen und permanentem Stress kommt schnell der Griff zu Präparaten wie Sildenafil (Viagra®) bei erektiler Dysfunktion, den enteral bzw. zentral wirksamen Antiadiposita Orlistat (Xenical®) und Sibutramin (Reductil®), Bupropion (Zyban®) gegen Nikotinsucht, Paroxetin (Seroxat®) als Antidepressivum gegen Schüchternheit und für Selbstbewusstsein, Melatonin (Circadin®) als Modedroge gegen Jet-lag und für gesunden Schlaf.

Bei der Diskussion um das Für und Wider der Entwicklung von Lifestyle- und Wellnessmedikamenten ist auch der sozialpolitische Aspekt in diese Überlegungen mit einzubeziehen. Physische Realitäten, welche früher als normal galten, werden heute als behandelbare Krankheiten gedeutet.

Der Spielraum der ‚Normalität‘ verengt sich. Das Ziel ist der optimale Mensch, nicht nur der gesunde.

Im Februar 1995 wurde NADH in seiner stabilisierten, oral applizierbaren Form (ENADA®) u. a. vor dem Hintergrund der o. g. vermuteten positiven klinischen Wirkungen als Nahrungsmittelergänzung in den Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen.

2. AUFGABENSTELLUNG

Wie dargestellt, spielt NADH eine bedeutende Rolle im Energiehaushalt der Zelle.

Weiterhin wird für NADH u. a. als Coenzym der endogenen L-DOPA-Synthese ein Einfluss auf verschiedene neurologische Erkrankungen, wie das Parkinson-Syndrom oder die Depression diskutiert. Klinische Studien nutzten diesen Ansatz und beschrieben eine positive therapeutische Wirkung von peripher appliziertem NADH bei diesen Krankheitsbildern.

Körpereigene bzw. ‚natürliche‘ Substanzen wie auch NADH sollen zudem die körperliche und geistige Leistungsfähigkeit ohne Nebenwirkungen steigern. In den verschiedenen Medien wurde und wird NADH als „medizinische Sensation“ gepriesen, welche u. a. die ‚natürlichen Abwehrkräfte‘ stärkt, den gesamten Organismus gegen ‚Umweltschadstoffe‘ und vor ‚geistiger und körperlicher Erschöpfung schützt‘ sowie ‚unser positives Denken beeinflusst‘.

Die pharmakokinetischen Grundlagen einer zentralen Wirksamkeit von peripher verabreichtem NADH sowie dessen Bioverfügbarkeit im ZNS sind derzeit jedoch nicht vollständig geklärt.

Im Zusammenhang mit den o. g. Studien über zentral stimulierende Wirkungen von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid stellte sich die Frage, ob peripher verabreichtes NADH im Körper resorbiert wird, die Blut-Hirnschranke überwindet und schließlich die zentrale NADH- Konzentration verändern kann?

Histochemische Methoden für die *in vitro*- Bestimmung von Nicotinamid-adenin-dinucleotiden gehören bereits seit längerem zur Routine [KLAIDMAN et al., 1995]. Die Möglichkeit des *in vivo*- Nachweises von NADH erlauben zusätzlich Aussagen zur möglichen Pharmakokinetik der applizierten Substanz.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die *in vivo*- Untersuchung der zentralen Bioverfügbarkeit von NADH im ZNS der narkotisierten Ratte nach lokaler, parenteraler und oraler Applikation mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. TIERMATERIAL

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistar Ratten (Wist /Shoe), der Firma Tierzucht Schönwalde GmbH verwendet.

Die Ratten wogen 200 ± 20 g. Alle Tiere wurden unter einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Regime (06:00/18:00) bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 55 ± 10 % gehalten. Eine Luftumwälzung erfolgte 10 mal/Stunde.

Das Futter, Standardpellets von Altromin 1326 und Wasser, standen den Tieren während der gesamten Zeit zur Verfügung.

Die Haltung erfolgte in Gruppen zu jeweils fünf Tieren in entsprechend großen Standardkäfigen [Makrolon-T4-Käfige: 40cm x 60cm x 25cm (Breite x Länge x Höhe)].

Alle Tiere wurden mindestens 8 Tage vor dem Versuchsbeginn zur Eingewöhnung im Tierstall des Institutes gehalten.

Die Versuche wurden in finaler Narkose durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch die intraperitoneale Applikation einer Überdosis Chloralhydrat.

Alle gesetzlich vorgeschriebenen Anträge zur Durchführung der Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo), Fachgebiet Veterinärwesen (Tierschutz, Tierseuchenentschädigung, Tierarzneimittel), Turmstr. 21 in 10559 Berlin unter der Anzeige A0057/00 vom 09.02.2000 bewilligt.

3.2. VERWENDETE SUBSTANZEN

Zur Anwendung kamen folgende Substanzen:

Substanz	Charge	Hersteller / Vertreiber
ENADA (NADH) 5 mg-Tabletten	MC 04905	Labor Birkmayer Universitätsstrasse. 12 , A-1090 Wien
β -NADH ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$)	Lot 128H7001	Sigma-Aldrich Riedstrasse 2, 89555 Steinheim
β -NAD ($C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$)	Lot 69H7008	Sigma-Aldrich Riedstrasse 2, 89555 Steinheim
Nicotinamid-Tabletten	4408	Labor Birkmayer Universitätsstrasse. 12 , A-1090 Wien
Vehikel-Tabletten (ohne Zusätze)	MC 02190	Labor Birkmayer Universitätsstrasse. 12 , A-1090 Wien
Nicotinsäureamid	Lot 28542-049	Sigma-Aldrich Riedstrasse 2, 89555 Steinheim
Natriumbicarbonat- Puffer (pH 8)		eigene Zubereitung

Tabelle 3 Angaben zu den verwendeten Substanzen

NADH, NAD^+ sowie Nicotinsäureamid wurden zur parenteralen Applikation in einem Natriumbikarbonat-Puffer gelöst. Natriumbikarbonat fungiert bei pH 8 als Stabilisator und Vehikel der NADH-, NAD^+ - und Nicotinamid-Lösungen [WESSLEY et al., 1997].

Die Substanzlösungen wurden an jedem Versuchstag frisch zubereitet. Nicht benötigte Lösungen wurden am Ende des Versuchstages verworfen.

Jede Versuchsreihe beinhaltete eine Kontrolltiergruppe, welche mit Natriumbikarbonat-Lösung behandelt wurde.

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die NADH-Fluoreszenz *in vivo* durch Gabe von Natriumbikarbonat- bzw. Natriumchloridlösung nicht beeinflusst wird [REX et al., 1999].

Das Applikationsvolumen betrug bei intravenöser und intraperitonealer Applikation 1 ml/kg KG und bei lokaler Gabe jeweils 5 μ l.

Bei oraler Gabe erhielten die Tiere jeweils 2 Tabletten á 5 mg NADH und Nicotinamid, bzw. 2 Tabletten wirkstofffreier Zubereitung.

Applikationsart	Dosis	Substanz
I lokal	5 μ l 5 μ l 10^{-5} Mol/l 5 μ l 10^{-4} Mol/l 5 μ l 10^{-5} Mol/l 5 μ l 10^{-4} Mol/l	NaHCO ₃ -Lösung NADH NADH NAD ⁺ NAD ⁺
II i.v.	1,0 ml/kg 10 mg/kg 50 mg/kg 10 mg/kg 50 mg/kg	NaHCO ₃ -Lösung NADH NADH NAD ⁺ NAD ⁺
III i.p.	1,0 ml/kg 10 mg/kg 50 mg/kg 10 mg/kg 50 mg/kg 10 mg/kg 50 mg/kg	NaHCO ₃ -Lösung Nicotinsäureamid Nicotinsäureamid NADH NADH NAD ⁺ NAD ⁺
IV oral	50mg/kg 50mg/kg	wirkstofffreie Zubereitung NADH Nicotinsäureamid

Tabelle 4 Applikationsarten, Dosierungen und verwendete Substanzen

3.3. TECHNISCHE DURCHFÜHRUNG

3.3.1. DAS LASERFLUOROSKOP LF 302

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie angewendet.

Hierbei wurden Lichtimpulse eines Stickstofflasers mit einer Anregungswellenlänge von 337 nm, einer Impulsleistung von 30 μ J, einer experimentell ermittelte Eindringtiefe von ca. 0,5 mm, einer Pulsfrequenz von 14 Hz und einer Impulsdauer von 0,35 ns genutzt.

Der Stickstofflaser richtet Laserimpulse über Strahlteiler, einen Umlenkspiegel und eine Sammellinse auf die Eintrittsöffnung des Lichtleitkabels, das sich im Fasereinkoppler befindet. Der Laserstrahl wird über eine Glasfasersonde mit einem Durchmesser von 100 μ m in das Kortextgewebe der Laborratte geleitet [BEUTHAN et al., 1990; FINK et al., 1993; REX et al., 1999].

Den optischen Steuerimpuls erhält der Laser über eine Lichtleitfaser von der Lasertriggerelektronik, die von einem Controller gesteuert wird. Ein Strahlteiler lenkt einen kleinen Anteil der Laserstrahlung auf eine Photodiode, welche ein Bestandteil der optischen Triggerschaltung ist. Mit diesem elektronischen Signal wird die Messelektronik mit den Laserimpulsen synchronisiert.

Eine zweite Glasfaser des gleichen Durchmessers überträgt die im Rattenkortex entstandene Fluoreszenz sowie das Streulicht zurück zur Messeinheit.

In einem optisch homogenen Medium wird Licht weitestgehend geradlinig weitergeleitet. Unter Streulicht versteht man nun den physikalischen Vorgang der Ablenkung eines Lichtstrahles durch ein Hindernis.

Das eingehende optische Signal wird mittels einer Y-Weiche über zwei Spektralfilter der Wellenlängenbereiche 450 ± 5 nm und 337 ± 5 nm zum Messkopf der beiden Photomultiplier (bzw. Sekundärelektronenvervielfacher - SEV) gelenkt. Diese haben die Aufgabe, die eingehenden Signale in messbare elektrische Pulse umzuwandeln. Durch Spektralfilter erfolgt eine Trennung von Streulicht und NADH-Fluoreszenz.

Ein nachgeschaltetes zeitliches Tor von 2 ns sorgt für die benötigte zeitliche Isolierung (Messfenster) und somit Spezifizierung der NADH-Fluoreszenz [ROVER et al., 1998; RIEPE et al., 1996; MOTTIN et al., 1997].

In den Versuchen wurde das Laserfluoroskop LF 302 der Firma IOM Innovative Optische Messtechnik GmbH, Berlin, Germany genutzt.

Die erhobenen Daten der NADH-Fluoreszenz, des Streulichtes und der Laserenergieleistung wurden mittels einer speziellen Software von einem IBM – kompatiblen Personalcomputer (PC) aufbereitet und zeitnah auf dem PC-Monitor graphisch und arithmetisch dargestellt, sowie für eine spätere Auswertung auf der Festplatte des Rechners gespeichert.

Um mögliche Artefakte, wie z.B. hämodynamische Effekte bei der NADH-Fluoreszenzmessung zu reduzieren, nutzten wir die bereits von HARBIG et al. 1976 und MAYEVSKI et al., 1984 beschriebene Methode der Subtraktion des Streulichtes (SL, scattered light) von der gemessenen NADH-Fluoreszenz (F) nach der Formel:

$$F = (F^{450 \text{ nm}} - SL^{337 \text{ nm}}).$$

Zum Ausschluss weiterer, aufgrund von differierenden Laserenergieleistungen entstandenen Artefakte und einer daraus resultierenden unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der NADH-Moleküle, wurde die gemessene NADH-Fluoreszenz stets in Relation zur aktuellen Laserenergie berechnet.

3.3.2. HERSTELLUNG DER MESSSONDEN

Aufgrund der geringen Glasfaserdurchmesser von jeweils 100 µm und der daraus resultierenden Fragilität der jeweils 5 Meter langen Sondenkabel, resultierte die Notwendigkeit des intermittierenden Ersatzes gebrochener Messsonden. Es wurden sowohl Messsonden der Firma IOM als auch in Eigenproduktion hergestellte Sonden genutzt:

Nach dem Zuschneiden der benötigten Glasfasern (AS 105/110 UVPI - Fa. FiberTech GmbH, Special Optical Fiber Technologies, Berlin) sowie der dazu passenden Schutzummantelungen (Fa. Thorlabs Inc., USA) wurden erstere vorsichtig in die jeweiligen Ummantelungen eingeführt. Der Glasfaserüberzug wurde beidseits durch Abbrennen entfernt. Im Anschluss daran wurden sowohl die abgebrannten Glasfaserenden, als auch die zu verwendenden Glasfaserkopplungen (Konnektoren) gründlich mit Methanol gereinigt. Nach Testung von Passgenauigkeit und Sauberkeit der benötigten Teile erfolgte die Zubereitung des Zwei-Phasen-Epoxy-Klebers. Dieser wurde im Anschluss

zur besseren Handhabbarkeit in eine 5 ml Einmalspritze abgefüllt. Mittels einer mitgelieferten Spezialkanüle wurde nun zunächst das Lumen des Konnektors mit Epoxydharz gefüllt. Unter langsamem Drehen wurde daraufhin die Glasfaser vorsichtig in den klebstoffgefüllten Konnektor vorgeschoben. Mit einer Lupe konnte die Integrität der Faser überprüft werden.

Die PVC-Faserummantelung wurde nun passgenau an die optische Glasfaserkopplung gesetzt, ein zuvor aufgezogener Crimpring übergeworfen und mittels einer Crimpzange erfolgte nun die kraftschlüssige Verbindung von Glasfaserummantelung und Konnektor. Dem schloss sich eine erneute Inspektion auf korrekten Sitz und Unversehrtheit des Systems an.

Eine Hülse aus Weich - PVC, welche gleichzeitig als äußerer Schutz des Konnektors fungierte, wurde ebenfalls mit Epoxydharz im Bereich des Überganges von Glasfaserkopplung und Ummantelung als Zugentlastung verklebt.

Adäquat erfolgte die anschließende Fertigung der korrespondierenden Sondenfaserkopplung sowie der Sondenspitze. Bei Zimmertemperatur benötigten die verklebten Bestandteile ca. 24 Stunden zur Aushärtung.

Der zweite große Fertigungsabschnitt umfasste die Politur der Sondenendigungen. Zunächst wurden die über das Epoxydharzbett stehenden Glasfaserenden mittels eines Diamantschneiders gekürzt. Bei der Kontrolle mit der Lupe durfte die Glasfaser nicht unterhalb des Epoxydharzniveaus gebrochen sein. Dieses kann ein korrektes Polieren weitestgehend unmöglich machen.

Der nächste Schritt beinhaltete das vorsichtige Polieren der überstehenden Glasfaser. Hierzu wurde mit einem Stück Schleifpapier der Körnung 5 μm behutsam das überstehende Glasfaserende auf das Niveau des Epoxydharzbettes geschliffen. Bei der anschließenden Kontrolle sollte die Glasfaser mit dem Epoxydharz eine glatte Fläche bilden. Nun erfolgte die vorbereitende Säuberung der Polierglasplatte mittels Methanol-lösung und Druckluft.

Der sich anschließende Arbeitsschritt des Polierens stellt den wohl empfindlichsten Abschnitt in der Sondenfertigung dar. Ein Brechen des freiliegenden Glasfaserendes unterhalb des Epoxydharzniveaus führte meistens zur irreparablen Schädigung der Sonde.

Daher wurde die zuvor in einer Polierhalterung fixierte Glasfaserkopplung mit äußerster Vorsicht auf das Schleifpapier der Körnung 5 μm aufgesetzt und unter behutsamer Steigerung der vertikalen Krafteinwirkung die Politur mit einigen Achtertouren (ca. 10)

begonnen. Nach Reinigung der Polierglasplatte und der Polierhalterung mit Methanol-
lösung und Druckluft schloss sich das Polieren mit Schleifpapier der Körnung 3 μm und
nachfolgend 1 μm in o. g. Vorgehensweise an. Die finale Politur mit der Körnung 0,3 μm
erforderte die Fixierung des Schleifpapiers auf der Polierglasplatte mit einigen Tropfen
Wasser zur Erhöhung der Adhäsionskräfte.

Ein abermaliges Säubern der Glasfaserkopplung sowie der Polierhalterung und der
Polierplatte mit Methanol und Druckluft beendete den Fertigungsprozess.

Die Abschlusskontrolle der so entstandenen Glasfaserkopplung erfolgte nach einer
definierten Checkliste unter Zuhilfenahme einer Lupenbrille.

In analoger Form wurde bei der Herstellung der kontralateralen Glasfaserkopplung
verfahren.

Zur Fertigung der nun noch benötigten Sondenspitze nutzten wir den äußeren Teil einer
Mikrodialyse-Sonde (CMA12), in welchem die beiden 100 μm starken Glasfasern
eingepasst wurden. Das Verkleben und Polieren der Sondenspitze erfolgte
entsprechend der Vorgehensweise bei der Anfertigung der Glasfaserkopplungen. Als
Polierhalterung wurde lediglich ein selbstgefertigter Messingblock mit entsprechender
mittiger Bohrung verwendet. Im Sinne der Stabilitätserhöhung im besonders kritischen
Bereich des Überganges zwischen Stahlkanüle und ummantelter Glasfasern sowie als
Handgriff diente eine Pipettenspitze für 100 μl Pipetten, welche über die Sondenspitze
gezogen mit Epoxydharz aufgefüllt ausgehärtet wurde.

3.4. VERSUCHDURCHFÜHRUNG

3.4.1. TECHNISCHE VORBEREITUNG UND WARTUNG DES LASERFLUORO- SKOPS LF 302

Hierzu zählte das regelmäßige, mindestens einmal wöchentliche Spülen des Stickstoff-
lasers mittels PNL-Gasbox der Fa. LTB-Lasertechnik Berlin sowie Stickstoff der
Reinheitsklasse 4.6 oder besser (Fa. Messer Griesheim GmbH).

Vor und nach jedem Versuch wurde die Spitze der Messsonde in einer Lösung aus
Ethanol und Wasser getränkt und mit einem Linsenreinigungstuch gesäubert. Dabei

wurde Wert auf die absolute Sauberkeit der Sondenspitze gelegt, da schon kleinste Verunreinigungen erhebliche Messfehler bedingen.

Zur Kalibrierung und Überprüfung der Funktionalität des Messsystems erfolgte vor jedem Versuch eine *in vitro* – Messung mit NADH-Lösung in den Konzentrationen 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l.

Das Messsystem wurde jeweils ca. 1 Stunde vor Versuchsbeginn aktiviert um eine konstante Betriebstemperatur der Apparatur vom Messbeginn an zu gewährleisten.

3.4.2. VERSUCHABLAUF

Es erfolgte nach vorangegangener Wägung des Versuchstieres die Narkotisierung mittels 400 mg/kg Chloralhydrat – Lösung intraperitoneal. Bei Abflachung der Narkose (Auftreten des Kornealreflexes und/oder des Wimpernreflexes) erfolgten Nachinjektionen mit 100 mg/kg Chloralhydrat – Lösung intraperitoneal.

Nach Erreichen der notwendigen Narkosetiefe (ca. 30 min) wurde der Kopf des Tieres in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf, USA) mit Ohrstiften fixiert. Um eine Unterkühlung des Versuchstieres und somit eine weitere Veränderung der Stoffwechsellage zu verhindern, wurde die Ratte auf einer selbstregulierenden Wärmematte - CMA Temperature Controller Carnegie Medicin, Schweden - gelagert.

Die Kalotte wurde auf einer Fläche von 0,5 cm x 1 cm unter semisterilen Bedingungen spitz und stumpf präpariert sowie auftretende Blutungen mit Gelaspon® gestillt. Das OP-Feld wurde dargestellt.

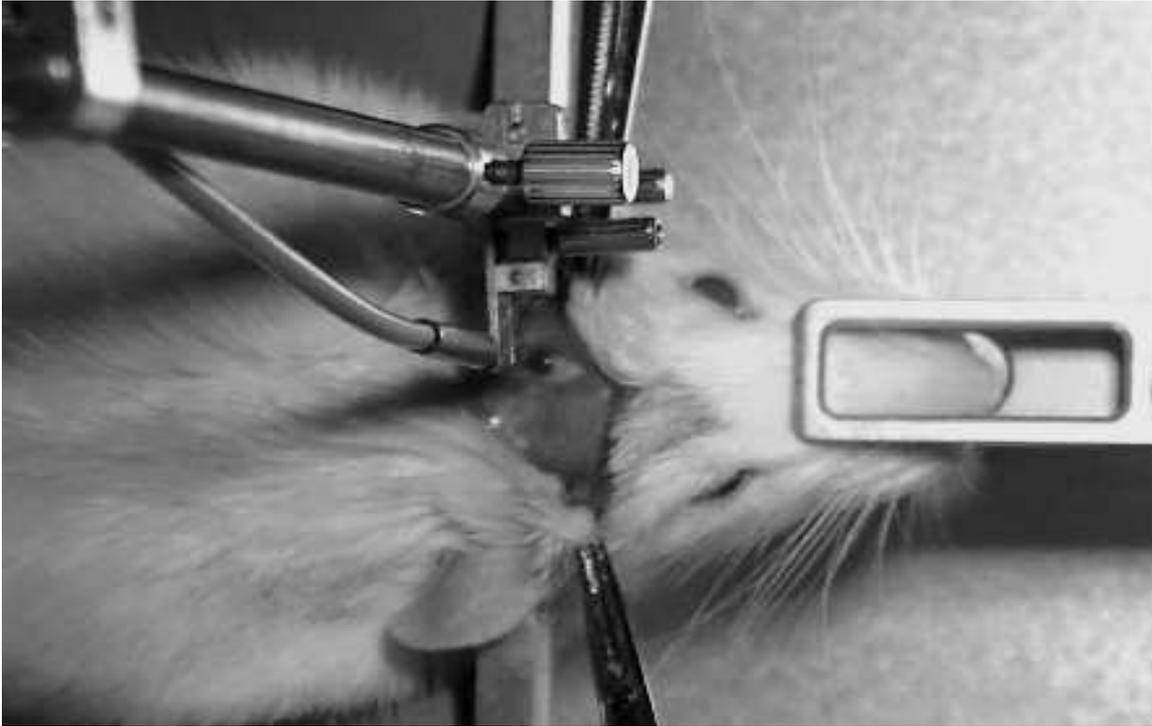


Abbildung 6 Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaues

Anschließend erfolgte, unter Schonung der Dura mater, mittels eines Handbohrers die senkrechte Trepanation des Schädelknochens 4 mm posterior und 2 mm lateral vom Bregma.

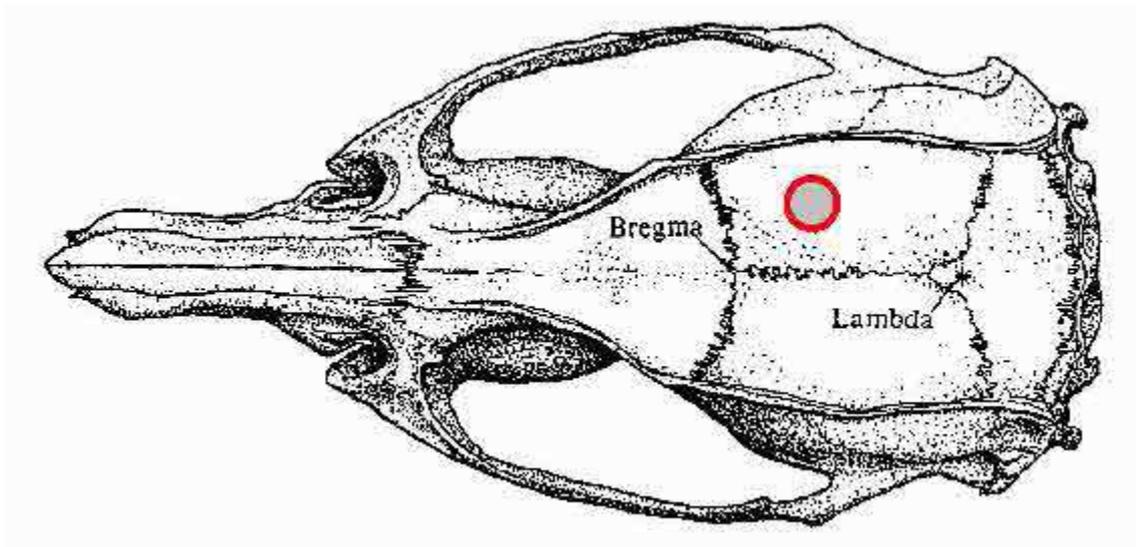


Abbildung 7 Region der Messsondenimplantation

Nach der Säuberung des Bohrloches wurde die Dura mater vorsichtig unter Verwendung einer Lupenbrille mit einem sterilen Lanzett-Skalpell eröffnet und auftretende Blutungen in o. g. Weise gestillt. Die an einem stereotaktischen Arm befestigte Lasersonde wurde über dem medialen, parietalen Kortex ausgerichtet und langsam der Hirnoberfläche angenähert. Ebenfalls unter Nutzung einer Lupenbrille erfolgte dann die Absenkung der Sonde in das Hirngewebe bis zur gewünschten Position (ca. 2 mm im medialen, parietalen Kortex; abhängig vom Optimum der dabei ermittelten NADH- und Streulichtmesswerte) mit einer Geschwindigkeit von ungefähr einem Millimeter in der Minute, um zusätzliche Schädigungen gering zu halten [BURES, 1983; STRONG et al., 1996].

Um zu verhindern, dass sich während des Versuches die physiologischen Verhältnisse der kortikalen Oberfläche im Bereich der Trepanation signifikant ändern, wurde unter Zuhilfenahme einer Präzisionspumpe - CMA 102 - eine kontinuierliche Befeuchtung mit oxigeniertem künstlichem Liquor (CSF, pH 7,4) gewährleistet. Dieser setzte sich aus 5 mM Glukose, 125 mM NaCl, 27 mM NaCO₃, 2,5 mM KCl, 0,5 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM NaSO₄, 1 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ zusammen.

Nach dem Einsetzen der Sonde wurde die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Aufgrund der intraoperativen Traumatisierung des Hirngewebes mit initialem Abfall der Fluoreszenzintensität wurden erst 30 Minuten nach Messbeginn Daten zur Auswertung genutzt.

Nach dem Erreichen einer konstanten Fluoreszenzstärke konnte die Testsubstanz verabreicht werden.

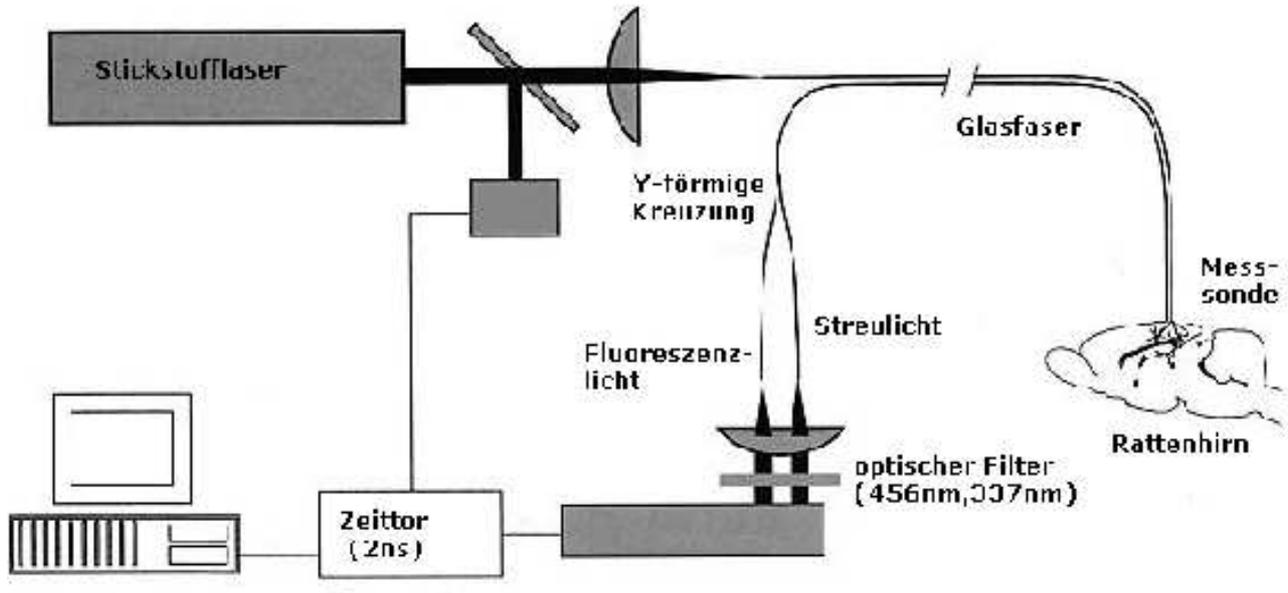


Abbildung 8 Schematischer Versuchsaufbau

3.4.3. BESONDERHEITEN BEI VERSUCHEN MIT INTRAPERITONEALER APPLIKATION

Voraussetzung ist hierbei eine gute Fixierung des Versuchstieres in der stereotaktischen Halterung (David Kopf, USA). Einstich und Injektion erfolgen bei gestrecktem Hinterbein im unteren, äußeren Quadranten der Bauchhöhle, etwa 2 - 4 cm lateral der Mittellinie. Dabei wird eine kurze Kanüle verwendet und die Nadel parallel zur hinteren Gliedmaße eingeführt. Durch die Bauchlage des Versuchstieres ist die intraperitoneale Injektion mit einem verhältnismäßig hohen Risiko an Fehlinjektionen, z.B. durch versehentliche Punktion von Blase, Darm, Milz etc. behaftet (ca. 5 - 10%). Deshalb erfolgt vor der Injektion eine Kontrolle durch vorsichtige Aspiration.

BESONDERHEITEN BEI VERSUCHEN MIT INTRAVENÖSER APPLIKATION

Zur Vorbereitung der intravenösen Gabe wurde den Tieren zu Beginn der Versuche ein zentralvenöser Verweilkatheter im Bereich der Vena femoralis gelegt. Hierzu erfolgte nach Narkotisierung des Versuchstieres die Fixierung der Ratte in Rückenlage. Um ein Verlegen der Atemwege durch die nach hinten fallende Zunge des Tieres zu

verhindern, wurde diese zuvor vorsichtig am geöffneten Maul arretiert. Im Bereich der Leistenbeuge wurde nun die Vena femoralis spitz und stumpf präpariert und mit zwei lockeren Ligaturen (Abstand ca. 0,5 cm) dargestellt. Nach behutsamer Inzision im Bereich der Tunica adventitia konnte nun ein schräg angeschnittener Kunststoffkatheter (FEP tubing) mit einem Innendurchmesser von 0,12 mm in die Vene eingeführt und mit einer Ligatur fixiert werden.

Zur Schonung der punktierten Vene wurde die zu applizierende Substanz mit einer Geschwindigkeit von maximal 5 µl/min injiziert.

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Applikation von Nicotinsäureamid keine Auswirkung auf die NADH-Fluoreszenz hat [KLIDMAN et al., 2001]. Aus diesem Grund wurde in unseren Untersuchungen bewusst auf die intravenöse Applikation von Nicotinsäureamid verzichtet.

BESONDERHEITEN BEI VERSUCHEN MIT ORALER APPLIKATION

Die orale Applikation der Filmtabletten (Durchmesser 5,44 mm, Tablettenhöhe 3,13 mm) und ein anschließend möglichst schneller Messbeginn erforderte die leichte Sedierung des Versuchstieres mit 200 mg/kg Chloralhydrat- Lösung intraperitoneal. Aufgrund der Untauglichkeit handelsüblicher Tabletten- Applikatoren verwendeten wir einen aus einer Eppendorf Combitips-Pipette (5,0 ml) selbstgefertigten, den physiologischen Gegebenheiten der Ratte angepassten Applikator.

Drei Minuten nach Injektion konnte mittels des Applikators die Filmtablette unter Ausnutzung des sich im Applikator befindlichen Wassers und des dadurch ausgelösten natürlichen Schluckreflexes verabreicht werden. Nach abschließender Inspektion des Rachenraumes konnten die verbleibenden 200 mg/kg Chloralhydrat – Lösung zur Erzielung der Narkose intraperitoneal nachinjiziert werden.

BESONDERHEITEN BEI VERSUCHEN MIT LOKALER APPLIKATION

Bei der zur Anwendung kommenden Messmethode stellte sich die Frage, ob es durch die operationsbedingte, lokale Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke zu Artefakten in der NADH-Fluoreszenzmessung kommen kann.

Da für peripher appliziertes NADH bis jetzt der experimentelle Nachweis einer Passage dieser selektiv durchlässigen Schranke zwischen Blut und Hirnsubstanz fehlt, musste untersucht werden, ob es durch die iatrogene Verletzung von Kapillaren und der Membrana gliae limitans perivascularis zu falsch-positiven Messergebnissen kommt.

So durfte die Messsondenspitze, wie in Vorversuchen praktiziert [REX et al., 1999], nicht ausschließlich auf die Kortexoberfläche aufgesetzt werden, sondern musste nach Trepanation des Schädelknochens und Durchtrennung der Dura mater, wie oben beschrieben, vorsichtig ca. 2 mm im medialen, parietalen Kortex platziert werden.

3.4.4. VERSUCHSENDE

Versuchstiere, welche nach Applikation einer letalen Dosierung von Chloralhydrat nicht den charakteristischen postmortalen Anstieg der gemessenen kortikalen NADH-Fluoreszenz (siehe 4.1. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation von Chloralhydrat in letaler Dosierung) aufwiesen, wurden für die Studienergebnisse nicht berücksichtigt [MOTTIN et al., 1997].

So konnte erst zum Abschluss jedes Versuchstages eine Validierung des durchgeführten Versuches erfolgen.

3.4.5. DATEN UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung wurde mit gepaarten Tests durchgeführt. Eine Differenz der Mittel-/Medianwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Mit Hinblick auf die Anschaulichkeit werden die Werte in dieser Arbeit jedoch als Mittelwert mit Standardfehler vom Mittelwert dargestellt ($n=10$).

Im Folgenden werden zur Standardisierung die Intensitätsänderungen der NADH-Fluoreszenz in sogenannten ‚arbitrary units‘ [AU] - dimensionslosen Einheiten - angegeben.

Die X-Achse der jeweiligen Grafik kennzeichnet die ermittelten NADH-Fluoreszenzänderungen im Kortex der narkotisierten Ratte, die Y-Achse die verstrichene Zeit.

Die dargestellten Messergebnisse wurden erneut statistisch mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test aufbereitet. Der Kruskal-Wallis-Test [KRUSKAL & WALLIS, 1952] ist als varianzanalytisches Verfahren eine Verallgemeinerung des U-Tests von WILCOXON, MANN & WHITNEY, dem Standardtest für zwei unterschiedliche Proben in der Medizin. Er wertet zusätzlich Informationen über die rangmäßige Abstufung der Stichprobenwerte. Hier wird der Unterschied von Verteilungen getestet und nicht der Unterschied von Mittelwerten. Es werden alle Originaldaten gesammelt, nach der Größe geordnet und in Ränge abgestuft. Anschließend wird die Rangreihenliste wieder nach Stichprobenzugehörigkeit aufgeteilt und für jede Stichprobe die Rangsumme gebildet.

4. ERGEBNISSE

Aufgrund der oben beschriebenen stereotaktischen Messsondenimplantation im Kortex des Versuchstieres kam es zur iatrogenen Traumatisierung von Gehirngewebe und somit zur Verfälschung der Messergebnisse. Daher wurden erst 30 Minuten nach endgültiger Positionierung der Messsondenspitze mit Erreichen einer konstanten Fluoreszenzintensität verwertbare Messungen erhoben.

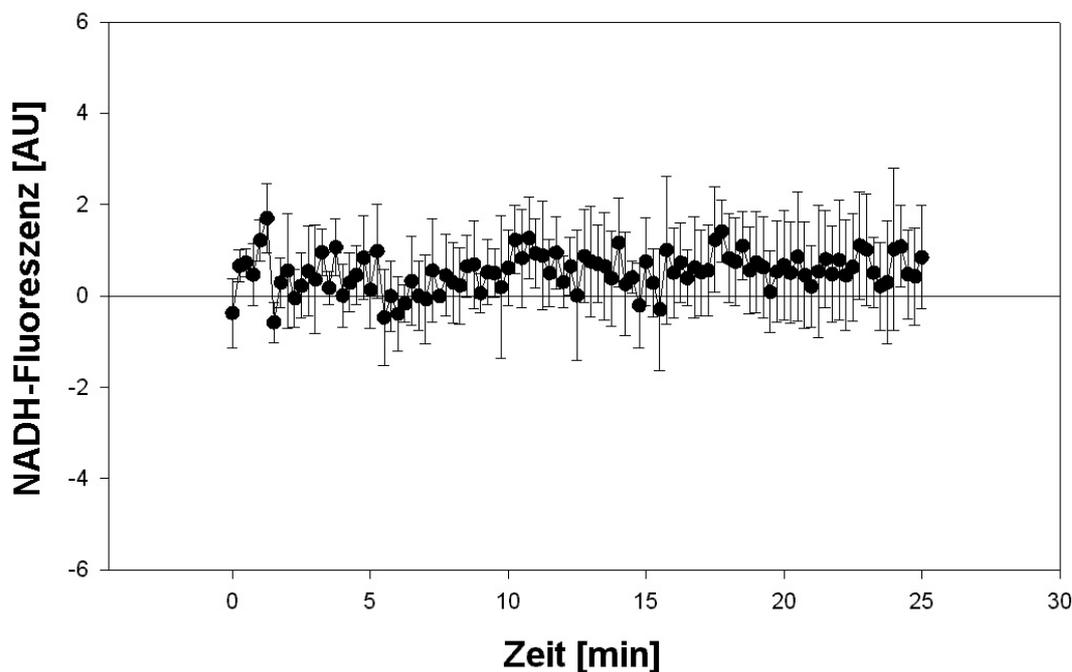


Abbildung 9 Gemessene NADH – Fluoreszenz ohne Wirkstoffapplikation. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10).

4.1. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAPERITONEALER APPLIKATION VON CHLORALHYDRAT IN LETALER DOSIERUNG

Den Ergebnissen nach Applikation der Prüfsubstanzen vorgehend, sollten zunächst die NADH-Fluoreszenzänderungen nach Euthanasie mit Chloralhydrat dargestellt werden.

Nach intraperitonealer Applikation von 2 g/kg KG Chloralhydrat kam es binnen 30-60 Sekunden zum Exitus der Laborratte. Unmittelbar nachfolgend stieg die gemessene kortikale NADH-Fluoreszenz bis zu einem gemittelten Wert von ≈ 16 AU an. Dieser Messwert war für ca. 15 Minuten nachweisbar.

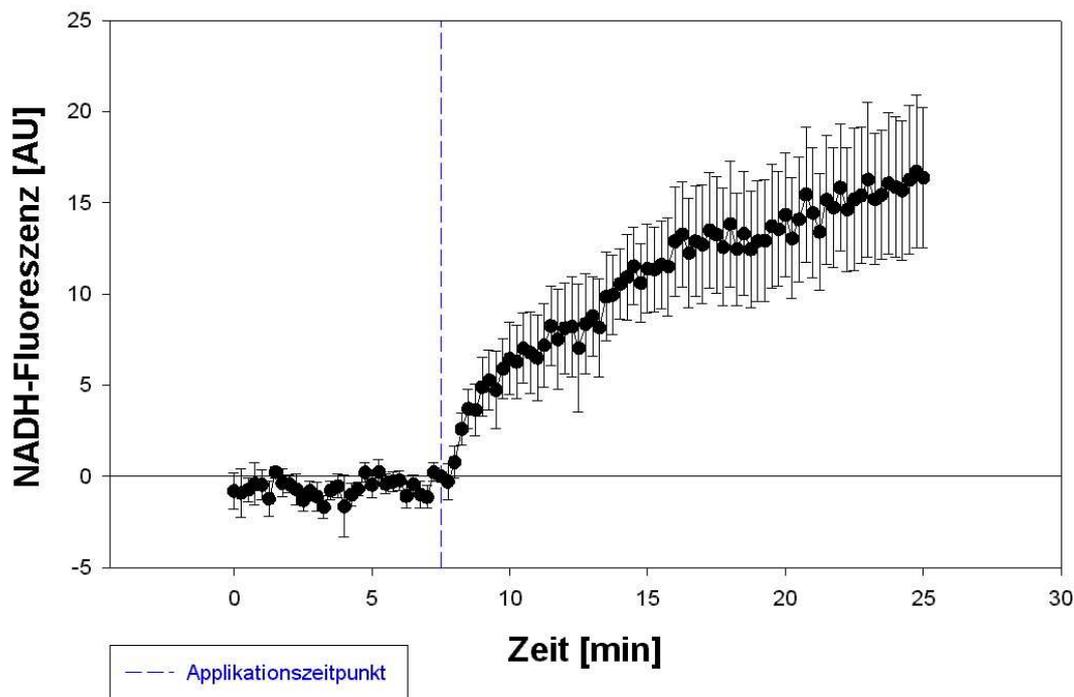


Abbildung 10 Einfluss der letalen Dosis Chloralhydrat auf die gemessene kortikale NADH-Fluoreszenz

Die in diesem Versuch gemittelten Werte um 16 AU stellen die maximal gemessene Fluoreszenzprogression im Kortex der narkotisierten Ratte dar und dienen somit nach finaler Narkose der Plausibilitätsprüfung am Ende eines jeden Versuches.

Dieser Maximalanstieg der NADH-Fluoreszenz wurde als Referenzpunkt unserer pharmakologischen Untersuchungen genutzt und als 100% der nachweisbaren Fluoreszenzänderung gewertet (16 AU = 100%).

Als Basiswert (0%) wurde die gemessene NADH-Fluoreszenz nach Erreichen eines steady state vor pharmakologischer Manipulation genommen.

Ein Ausbleiben dieser charakteristischen, postmortalen NADH-Fluoreszenzerhöhung schloss eine Nutzung der ermittelten Daten aus. Die Rate dieser nicht zu bewertenden Untersuchungen betrug ca. 15 %. Als Ursachen können zum einen iatrogene

Verunreinigungen der Messsondenspitze als auch technische Artefakte benannt werden.

Eher für den Zeitraum zwischen Operation der Laborratte und Beginn der Messung relevant, stellte sich der Umstand dar, dass einige Ratten trotz einer exakt auf ihr Körpergewicht berechneten Dosis Chloralhydrat intraperitoneal überdurchschnittlich lange bis zum Erreichen der für die Operation notwendigen Narkosetiefe benötigten. Diese Versuchstiere wurden im Allgemeinen für den entsprechenden Tag von der Untersuchung ausgeschlossen und erst nach ca. 5 Tagen zum erneuten Versuch herangezogen – vorausgesetzt, ihr Körpergewicht lag noch im Toleranzbereich von 200 ± 20 g.

4.2. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH LOKALER APPLIKATION VON NADH-LÖSUNG

Wie nachfolgend dargestellt, wurde NADH-Lösung in definierten Konzentrationen lokal, d.h. direkt neben der Glasfasersonde auf der Kortexoberfläche appliziert.

Diese gewählten Konzentrationen von 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l basierten auf einer vorab experimentell ermittelten *in vitro* – Standardmesskurve (siehe Tabelle 10), sodass ein Durchdringen des NADH von der Kortexoberfläche zur Sondenspitze sich durch eine Zunahme der gemessenen NADH-Fluoreszenz bemerkbar machen müsste.

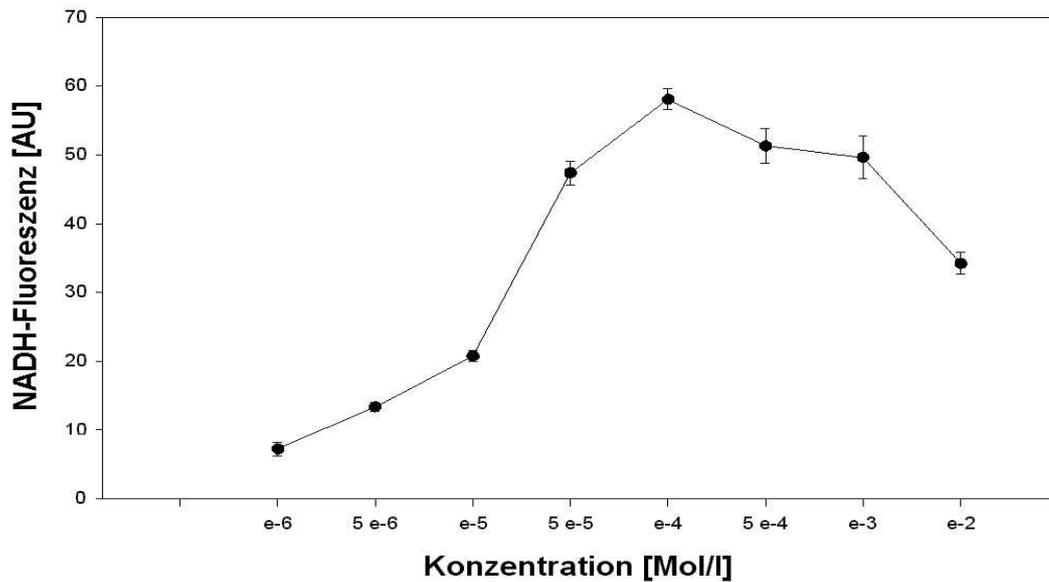


Abbildung 11 Einfluss der *in vitro* - NADH-Konzentration auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=6).

4.2.1. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH LOKALER APPLIKATION NADH-LÖSUNG

In der ersten Versuchsreihe wurde in Natriumbikarbonat-Puffer gelöstes NADH lokal, direkt auf die Kortexoberfläche des Versuchstieres appliziert. Wie oben genannt, erfolgte die Gabe der NADH-Lösungen in Konzentrationen von 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l.

Die Applikation erfolgte mit Hilfe einer an einem zweckentsprechenden Ständer befestigten Mikroliterspritze (5 μ l) nach vorangegangener behutsamer Säuberung und Trocknung der Kortexoberfläche.

Jede Versuchsreihe beinhaltet eine Kontrollgruppe mit Natriumbikarbonat-Lösung.

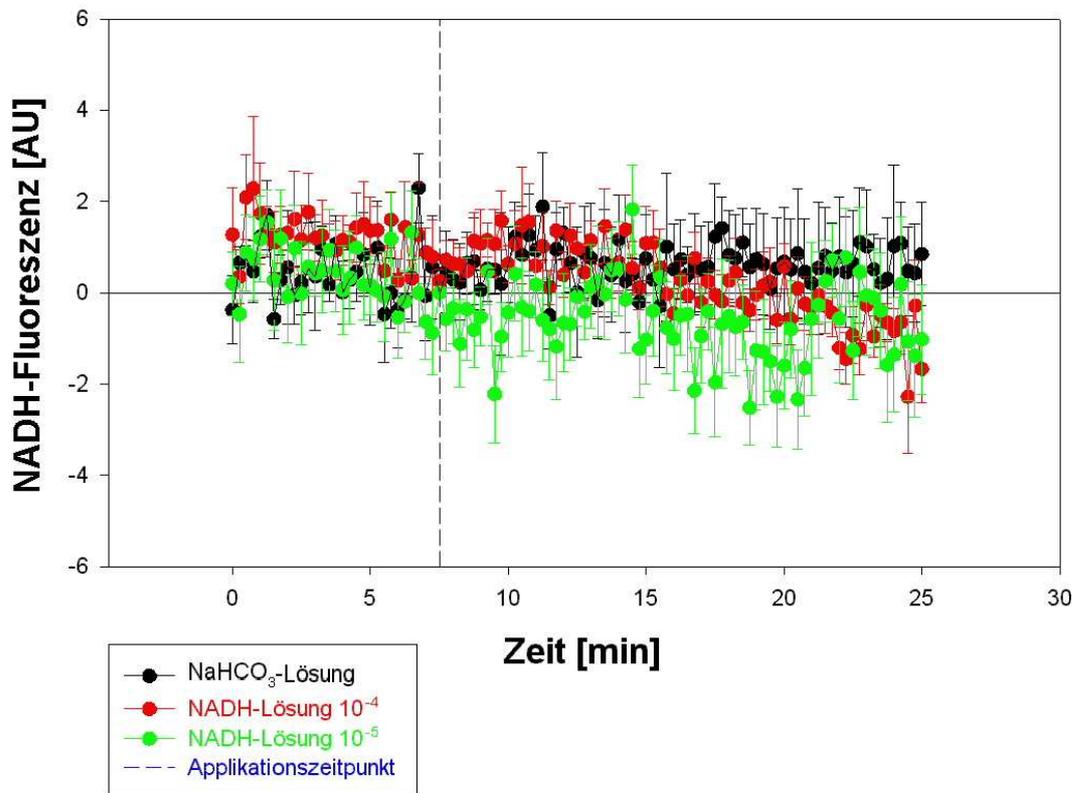


Abbildung 12 Wirkung von lokal applizierter NADH-Lösung (10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10).

Wie die Abbildung belegt, hatte analog zu den mit Natriumbikarbonat-Lösung behandelten Kontrolltieren NADH-Lösung der Konzentration 10^{-4} Mol/l noch 10^{-5} Mol/l während der gesamten Messdauer keinen Einfluss auf die gemessene kortikale NADH-Fluoreszenz.

4.2.2. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH LOKALER APPLIKATION VON NAD⁺-LÖSUNG

Wie auch in den folgenden Versuchsreihen wurde einer Vergleichsgruppe NAD⁺ appliziert.

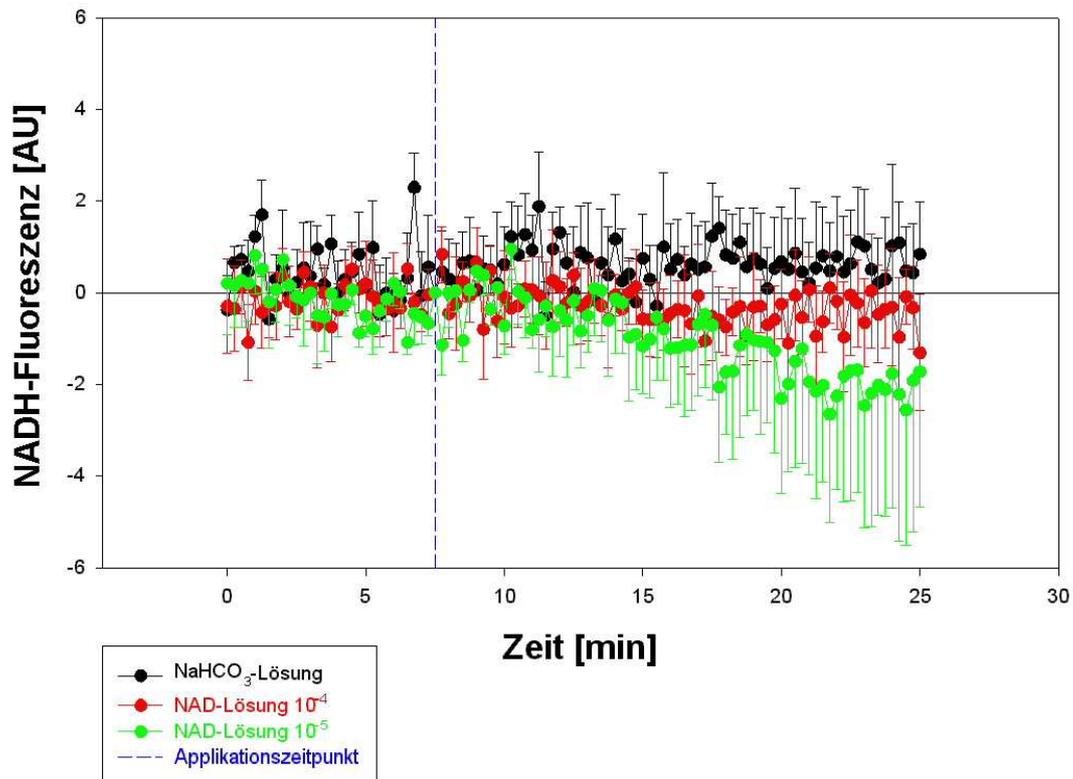


Abbildung 13 Wirkung von lokal applizierter NAD⁺-Lösung (10⁻⁴ Mol/l und 10⁻⁵ Mol/l) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10).

Wie die Abbildung verdeutlicht, kommt es, verglichen mit der Natriumbikarbonat-Kontrollgruppe, weder bei NAD⁺-Lösung der Konzentration 10⁻⁴ Mol/l noch bei 10⁻⁵ Mol/l zu einer Änderung der NADH-Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Tiere.

Die Gabe von NADH - und NAD⁺ - Lösungen (je 5 µl) in den Konzentrationen 10⁻⁴ Mol/l und 10⁻⁵ Mol/l auf die Kortexoberfläche der Laborratte hatte keine Auswirkungen auf die gemessene NADH-Fluoreszenz im Kortex.

4.3. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION

Nachdem im vorangegangenen Untersuchungsabschnitt eine Diffusion der zu untersuchenden Substanzen von der Oberfläche in den Kortex ausgeschlossen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die periphere Gabe von NADH eine messbare Fluoreszenzverstärkung im Kortex der Ratte erzeugt.

In den anschließenden Versuchen wurden deshalb die Substanzen intravenös verabreicht (siehe auch Punkt 3.4.3. Besonderheiten bei Versuchen mit intravenöser Applikation).

4.3.1. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON NADH-LÖSUNG

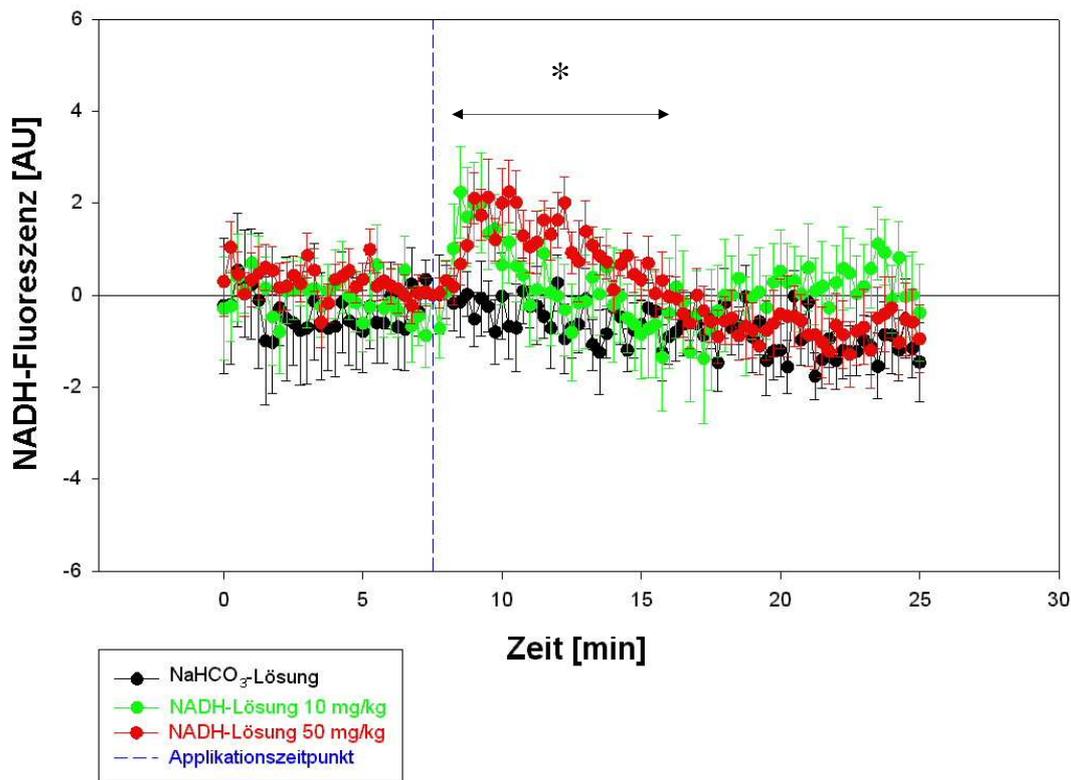


Abbildung 14

Wirkung von intravenös applizierter NADH-Lösung (10 mg/kg und 50 mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10), * p<0,05.

Nach Gabe von Natriumbikarbonat-Lösung zeigte sich keine Änderung im Fluoreszenzverhalten.

Dem entgegen kam es unmittelbar nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg NADH zum raschen Anstieg der kortikalen NADH-Fluoreszenz auf einen Wert von 2,37 AU. Berücksichtigt man das im Rahmen der finalen Narkosen gemessene Fluoreszenzmaximum von 16 AU, ergibt sich eine Verstärkung der nachweisbaren intrakortikalen Fluoreszenz von 14,8%. Die Fluoreszenzzunahme hielt, wiederum verglichen mit der Natriumbikarbonat-Kontrollkurve, für insgesamt ca. 4 Minuten an.

Im nächsten Abschnitt dieser Versuchsreihe wurde NADH-Lösung in der fünffachen Dosierung appliziert.

Es kam ebenfalls zu einer prompten, wenn auch - verglichen mit der Applikation von 10 mg/kg NADH - verzögerten Progression der Fluoreszenzwerte. Die gemessene kortikale NADH-Fluoreszenz stieg gegenüber der Kontrollkurve auf 2,93 AU. Es war insgesamt, bezogen auf die maximal mögliche Fluoreszenzerhöhung, eine Steigerung der nachweisbaren NADH-Fluoreszenz um 18,3% festzuhalten. Die Dauer der Fluoreszenzerhöhung belief sich hier auf ca. 9 Minuten.

4.3.2. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAVENÖSER APPLIKATION VON NAD⁺-LÖSUNG

Nach intravenöser Applikation von NAD⁺-Lösung kam es, vergleichbar mit der zuvor besprochenen NADH- Versuchsreihe, ebenfalls zu einem raschem und steilen Anstieg der gemessenen Fluoreszenzwerte.

Applikationen von 10 mg/kg NAD⁺-Lösung intravenös bewirkten eine unmittelbare Steigerung der NADH-Fluoreszenz auf 2,67 AU. Das ist eine Zunahme von 16,7 %. Dieser positive Effekt war für ca. 3 Minuten nachweisbar.

Die anschließende Gabe von 50 mg/kg NAD⁺-Lösung intravenös zeigte ähnlich der oben besprochenen Versuchsreihe mit NADH-Lösung eine im Vergleich zur geringeren Dosis stärkere Zunahme der NADH-Fluoreszenz. Im Mittel betrug der maximale Anstieg 3,94 AU. Das bedeutet eine Fluoreszenzzunahme von 24,6 %.

Nach intravenöser Applikation von 50 mg/kg NAD⁺-Lösung zeigte sich eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals für ca. 9 Minuten.

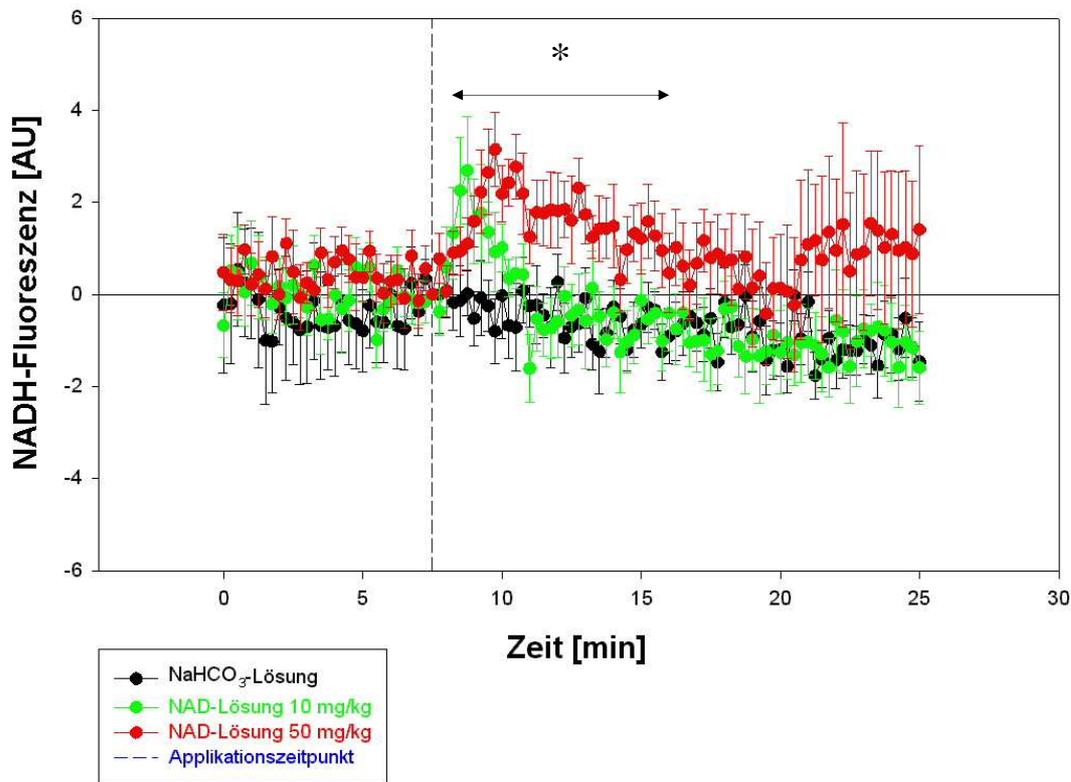


Abbildung 15 Wirkung von intravenös applizierter NAD⁺-Lösung (10 mg/kg und 50 mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10), * p<0,05.

4.4. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESSENZ NACH INTRAPERITONEALER APPLIKATION

Durch die vorangegangene intravenöse Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die periphere intravenöse Applikation von sowohl NADH- als auch von NAD⁺-Lösung eine signifikante Steigerung der NADH-Fluoreszenz im Kortex des narkotisierten Versuchstieres hervorruft.

So lag die gemittelte Zunahme der Fluoreszenz im Vergleich zu den mit Natriumbikarbonat-Lösung behandelten Tieren zwischen 14,8 % und 24,6 %.

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob peripher appliziertes NADH vom Organismus der Ratte resorbiert wird, in den Blutkreislauf gelangt und ebenfalls entsprechende zentrale Fluoreszenzänderungen bewirkt.

Als praktikable und zum Standard bei entsprechenden Tierversuchen gehörende Methode bot sich die intraperitoneale Applikation an.

4.4.1. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAPERITONEALER APPLIKATION VON NADH-LÖSUNG

Aufgrund der zu erwartenden resorptionsbedingten Verzögerungen wurden die Untersuchungszeiten nach Wirkstoffapplikation, im Vergleich zu den vorherigen Versuchen, verdoppelt.

Wie in Abbildung 15 ersichtlich, sank das gemessene Fluoreszenzsignal der Natriumbikarbonat-Kontrollösung nach Applikation deutlich unter das Ausgangswertes.

Die intraperitoneale Applikation von NADH-Lösung der Konzentration 10 mg/kg hatte keinen Einfluss auf die gemessene NADH-Fluoreszenz.

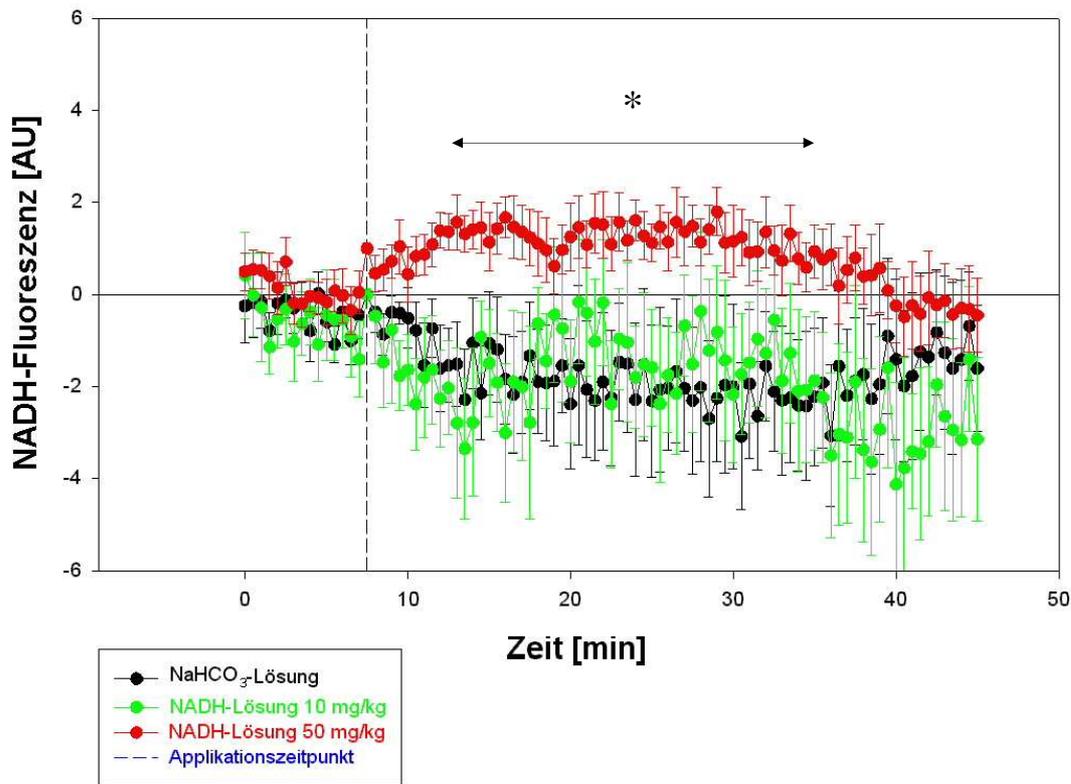


Abbildung 16 Wirkung von intraperitoneal applizierter NADH-Lösung (10 mg/kg und 50 mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10), * p<0,05.

Nach Applikation von 50 mg/kg NADH intraperitoneal stieg die NADH-Fluoreszenz im Rattenkortex gegenüber der Natriumbikarbonat-Kontrollkurve auf einen gemittelten Wert von 3,39 AU.

Dies entspricht einer Steigerung der gemessenen Fluoreszenzwerte um 21,2 %. Dieser positive Effekt war für ca. 30 Minuten messbar.

4.4.2. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAPERITONEALER APPLIKATION VON NAD⁺-LÖSUNG

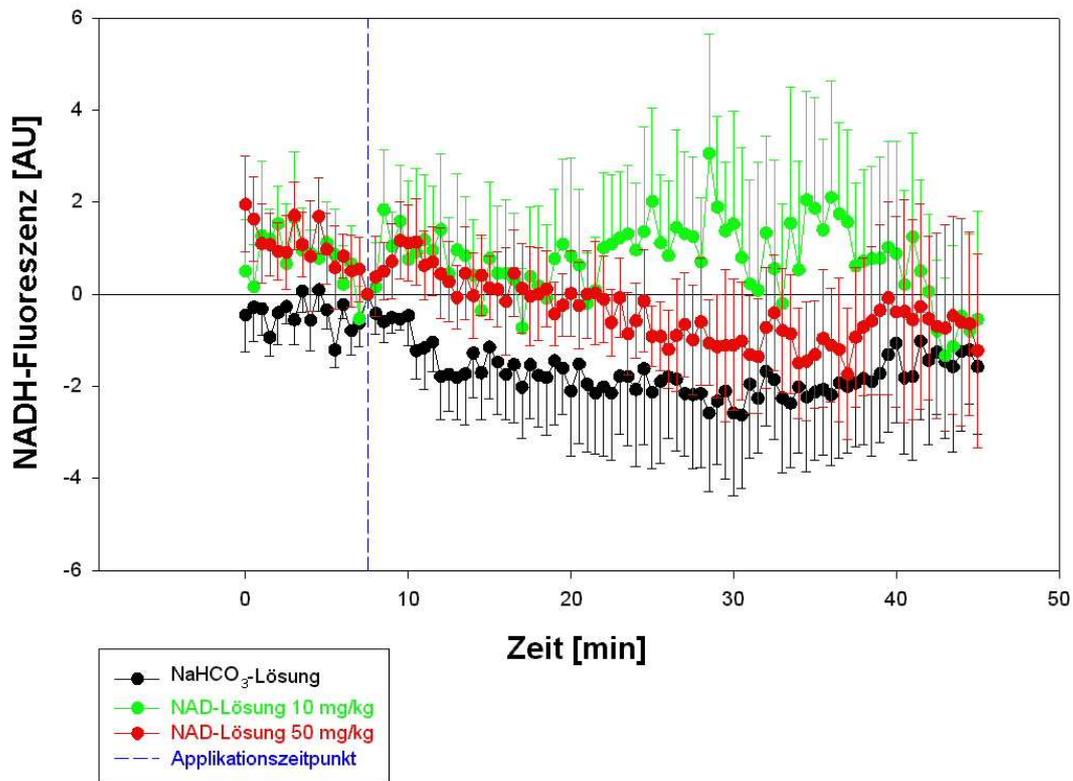


Abbildung 17 Wirkung von intraperitoneal applizierter NAD⁺-Lösung (10 mg/kg und 50 mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10), * p<0,05.

Im Vergleich zu der NADH-Konzentration bei den Vergleichstieren zeigte sich nach intraperitonealer Verabreichung von NAD⁺-Lösung sowohl in der Dosierung von 10 mg/kg als auch bei 50 mg/kg über die gesamte Dauer der Messung keine Erhöhung der kortikalen NADH-Fluoreszenzwerte.

4.4.3. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH INTRAPERITONEALER APPLIKATION VON NICOTINSÄUREAMID-LÖSUNG

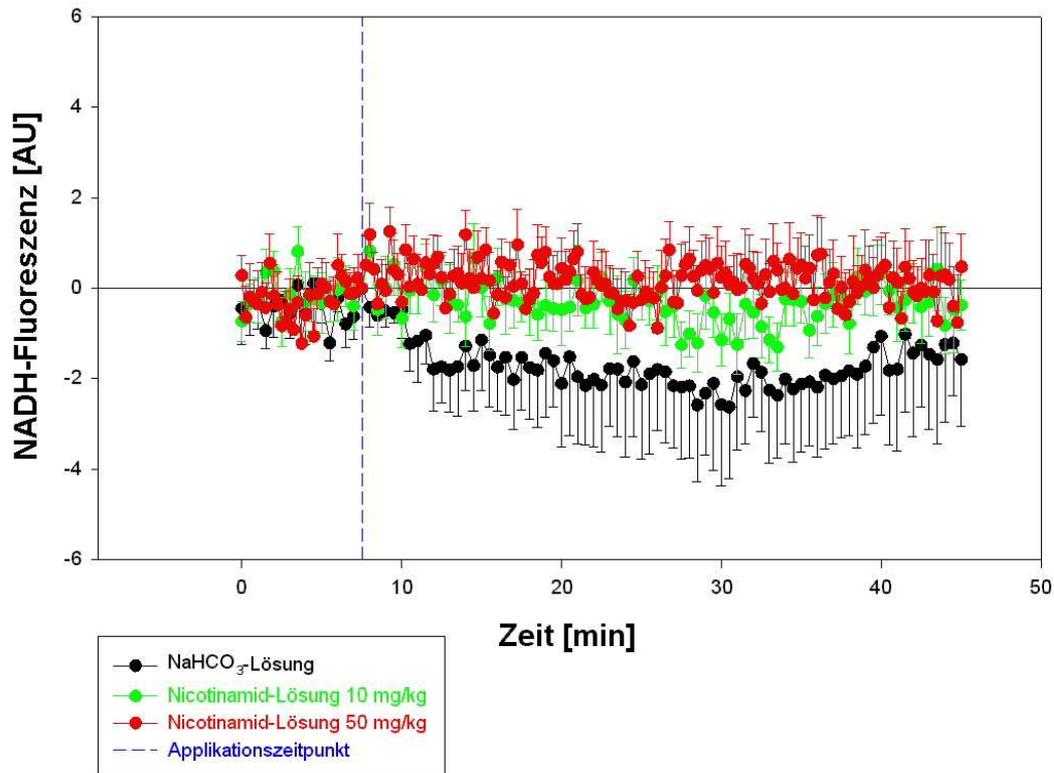


Abbildung 18 Wirkung von intraperitoneal applizierter Nicotinsäureamid-Lösung (10 mg/kg und 50 mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10).

Nicotinsäureamid bewirkte nach der intraperitonealen Verabreichung sowohl in der Dosierung von 10 mg/kg als auch von 50 mg/kg über die gesamte Dauer der Messung keine signifikante Veränderung der nachweisbaren NADH-Fluoreszenz.

Entgegen der auch in diesem Versuch mitgeführten Kontrollgruppe mit Natriumbicarbonat-Lösung bewegten sich die Fluoreszenzmesswerte nach Gabe von Nicotinsäureamid im Zeitraum der durchgeführten Messung im Bereich der gemessenen Ausgangswerte.

4.5. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH ORALER APPLIKATION

Den vorliegenden Ergebnissen nach parenteraler Applikation der Versuchssubstanzen schloss sich die Untersuchung der NADH-Konzentration nach oraler Gabe an.

Konnte nach intravenöser und intraperitonealer Applikation von NADH eine Änderung der gemessenen kortikalen NADH-Fluoreszenz nachgewiesen werden, stellte sich die Frage, ob ebenfalls die orale Gabe von NADH reproduzierbare Modifikationen der NADH-Fluoreszenzwerte bewirken kann.

4.5.1. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH ORALER APPLIKATION VON NADH

Bei der Versuchsreihe mit oraler Applikation wurden als Kontrolle von der Firma Birkmayer hergestellte und überprüfte Placebotabletten in den zur Testsubstanz ENADA[®] (NADH) adäquaten Dimensionen genutzt.

Es erfolgte die orale Applikation von jeweils zwei Tabletten ENADA[®] (NADH) á 5 mg. Das entspricht einer durchschnittlichen Dosierung von $51,1 \pm 1,1$ mg/kg.

Wie in der Abbildung 18 ersichtlich, war die gemessene kortikale Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung, d.h. direkt nach Einsetzen der Messsonde für ca. 5 Minuten gegenüber den Ausgangswerten erhöht.

Im weiteren Versuchsverlauf zeigte sich jedoch keine Änderung der nachweisbaren NADH-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Placebotabletten.

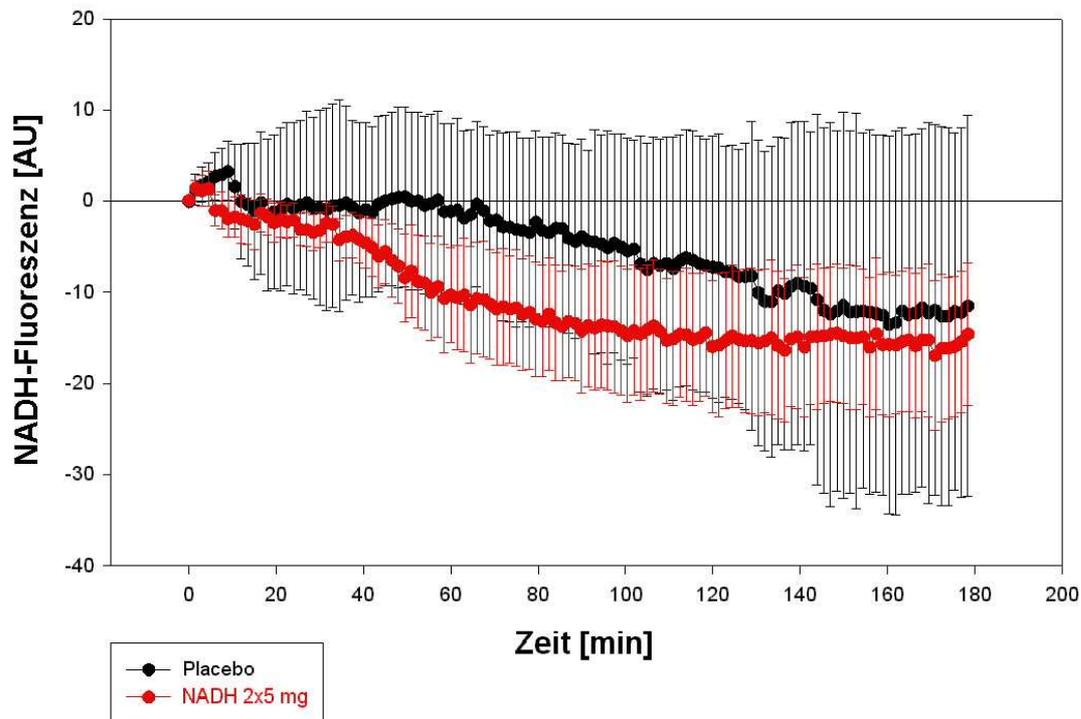


Abbildung 19 Wirkung von oral appliziertem NADH ($51,1 \pm 1,1$ mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10).

4.5.2. VERÄNDERUNG DER NADH-FLUORESZENZ NACH ORALER APPLIKATION VON NICOTINSÄUREAMID

Nicotinsäureamid wurde in der gleichen Dosierung, d.h. je 2 Tablette á 5 mg pro Versuchstier angewendet. Das entspricht wiederum einer durchschnittlichen Dosierung von $51,1 \pm 1,1$ mg/kg.

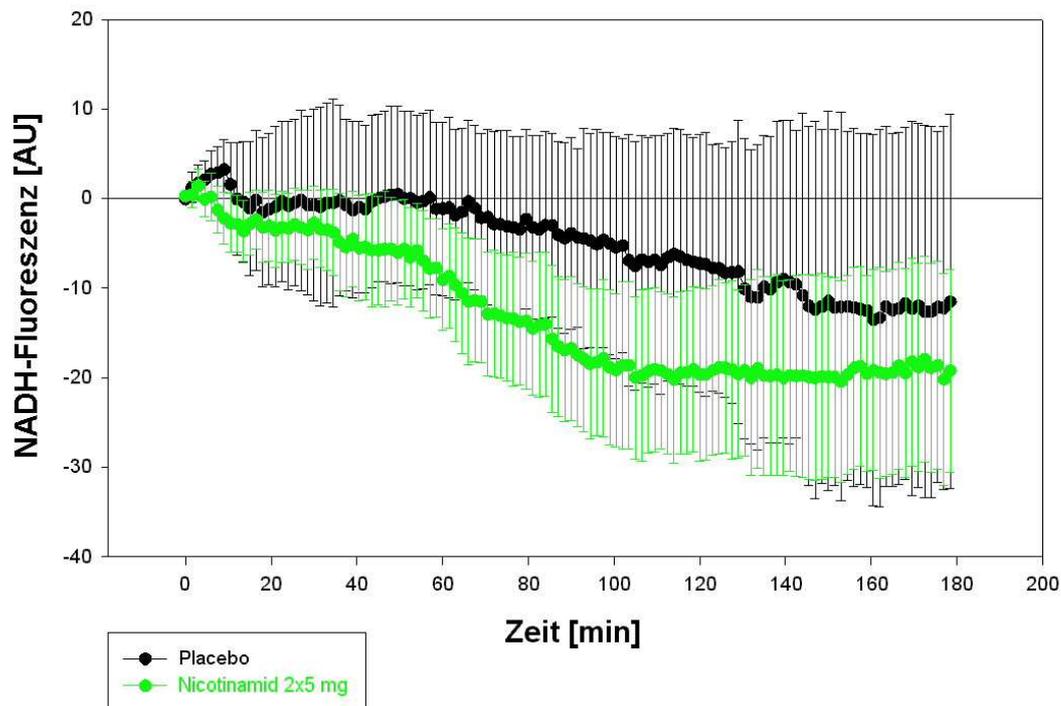


Abbildung 20 Wirkung von oral appliziertem Nicotinsäureamid ($51,1 \pm 1,1$ mg/kg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war auch hier, entsprechend der vorangegangenen Versuchsreihe mit ENADA[®]-Tabletten, nach oraler Verabreichung von Nicotinsäureamid kein Einfluss auf die kortikale Fluoreszenzintensität nachweisbar.

Nach Aufarbeitung und Analyse der erhobenen Daten zeigte sich mittels des Kruskal-Wallis-Test zu Beginn der Messungen mit oraler Wirkstoffapplikation ein statistisch signifikanter Unterschied nach Gabe von 2 Tablette ENADA[®] (NADH) á 5 mg im Vergleich zum ebenfalls oral appliziertem Placebo bzw. dem Nicotinsäureamid (siehe Abbildung 20).

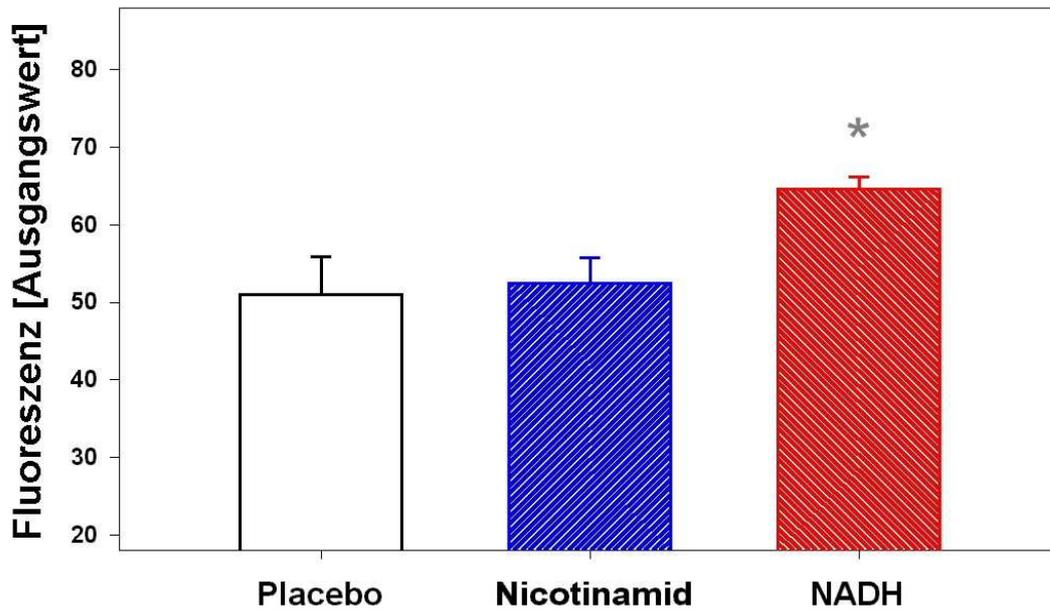


Abbildung 21 Wirkung von oral appliziertem Placebo, Nicotinsäureamid (2x5 mg) und NADH (2x5 mg) auf die gemessene NADH-Fluoreszenz **unmittelbar nach Applikation**. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n=10, * p<0,05).

4.5.3. ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHERGESBISSE

Eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse der kortikalen NADH-Fluoreszenz nach lokaler, intravenöser, intraperitonealer und oraler Applikation von NADH, NAD⁺ und Nicotinsäureamid zeigt Tabelle 5.

Während die lokale Verabreichung der Substanzen keine Änderung der Fluoreszenzwerte erbrachte, zeigte innerhalb des definierten Beobachtungszeitraumes die intravenöse Gabe von NADH einen Anstieg der kortikalen NADH-Fluoreszenz von 14,8% bei einer Dosis von 10 mg/kg sowie 18,3% bei fünffacher Dosierung.

Bei NAD⁺ konnte gar eine Fluoreszenzsteigerung von 16,7% bei 10 mg/kg, sowie 24,6% bei 50 mg/kg ermittelt werden.

Intraperitoneal zeigte sich lediglich bei der Dosierung von 50 mg/kg eine Erhöhung der kortikalen Fluoreszenz von 21,2%.

Im Rahmen der Versuche mit oraler Applikation war nur nach Aufarbeitung der Daten direkt nach Verabreichung von NADH eine signifikante Fluoreszenzsteigerung für ca. 5 Minuten nachweisbar.

Applikationsart	Dosis	Substanz	NADH-Fluoreszenzänderung [A.U.]	NADH-Fluoreszenzänderung [%]	Dauer der Änderung
lokal	10-4 Mol/l	NADH	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	10-5 Mol/l	NADH	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	10-4 Mol/l	NAD+	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	10-5 Mol/l	NAD+	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
intravenös	10 mg/kg	NADH	+ 2,37 A.U.	+14,8%	ca. 4 min
	50 mg/kg	NADH	+ 2,93 A.U.	+18,3%	ca. 9 min
	10 mg/kg	NAD+	+ 2,67 A.U.	+16,7%	ca. 3 min
	50 mg/kg	NAD+	+ 3,94 A.U.	+24,6%	ca. 9 min
intraperitoneal	10 mg/kg	NADH	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	50 mg/kg	NADH	+ 3,39 A.U.	+21,2%	ca. 30 min
	10 mg/kg	NAD+	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	50 mg/kg	NAD+	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	10 mg/kg	Nicotinamid	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	50 mg/kg	Nicotinamid	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
oral	2x5 mg	NADH	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung
	2x5 mg	Nicotinamid	keine Änderung	keine Änderung	keine Änderung

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse

5. DISKUSSION

Die für die unterschiedlichen Funktionen der eukaryoten Zelle benötigte Energie wird durch den Aufbau von Adenosintriphosphat (ATP) bei den Vorgängen der inneren Atmung als auch durch die thiolytische Spaltung der Fettsäuren und bei der Glykolyse bereitgestellt [MITCHELL et. al., 1961].

Speziell im ZNS wird der überwiegende Anteil, ca. 40-50% der verfügbaren Energie, für zellfunktionelle Prozesse, wie dem Natrium-Kalium-Transport benötigt. Etwa 20-30% der Energie wird vom intrazellularen Messengersystem und nur ca. 5-15% vom vegetativen Zellmetabolismus verbraucht. Die Energiereserven des ZNS reichen für die Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktionen nur ca. 80 Sekunden [SCHMIDT, 2007].

Die somit essentiell hohe Effizienz des Energiemetabolismus wird zum einen durch die räumliche Nähe der ATP-generierenden Enzyme sowie die Kopplung von ATP-Bildung und ATP-Verbrauch bei räumlich differierten Orten determiniert [AMES, 2000].

Glucose und Fettsäuren sind wichtige Energielieferanten. Ihr oxidativer Abbau liefert vor allem den in den Mitochondrien für die Atmungskette und damit für die daran gekoppelte Synthese von ATP erforderlichen Substratwasserstoff in Form von NADH bzw. FADH₂. NADH spielt als Cosubstrat im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung eine zentrale Rolle im mitochondrialen Energietransfer. Es ist somit ein wichtiger Parameter des Zellmetabolismus.

Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung besitzt große Bedeutung bei der Energiegewinnung des eukaryotischen Organismus. Hier werden 95% des Energiehaushaltes der Zelle generiert [ERECINSKA und WILSON, 1982].

Die Glykolyse ist wiederum im anaeroben Medium der zentrale ATP-Generator. Sie stellt den zentralen Prozess beim Abbau der Kohlenhydrate dar [STRYER, 1988].

Bei der Glykolyse werden aus der Energie eines Glucosemoleküls lediglich 2 Moleküle ATP generiert, hingegen bei der Oxidation von Pyruvat in den Mitochondrien etwa 30 Moleküle. Der hohe Energiebedarf hoch spezialisierter Vielzeller kann mit der anaeroben Glykolyse allein nicht abgedeckt werden [REITZ, 2002].

Störungen der mitochondrialen Atmungskette werden als Teil interaktiver Prozesse bei der Pathogenese bedeutender neurodegenerativer Erkrankungen, wie z. B. der Alzheimer-Krankheit, dem Parkinson-Syndrom und der Amyotrophen Lateralsklerose

(ALS) vermutet [ORTH und SCHAPIRA, 2002, SWERDLOW et al., 1996, BEAL et al., 1993 und 1995, BOWLING et al., 1995, KISH et al., 1992, PARKER et al., 1994].

So werden durch Defekte des transmembranösen Potentials der Mitochondrien z.B. Cytochrom C in das Cytosol abgegeben und dadurch u.a. apoptotische Prozesse vorangetrieben [BYRNE, 2002]. Mitochondriopathien sind laut Deutscher Gesellschaft für Neurologie und Mitochondriale Erkrankungen klinisch, biochemisch und genetisch heterogene Krankheiten, die auf Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels beruhen. Besonders Organsysteme mit einem hohen Energie- und Sauerstoffbedarf, wie z.B. das Gehirn und die Skelettmuskulatur, sind hierbei betroffen. Genetisch determinierte oder erworbene mitochondriale DNA -Mutationen bewirken v. a. bei der oxidativen Phosphorylierung und dem Fettsäureabbau ein Funktionsdefizit des lokalen Energiestoffwechsels [LÖBERT, 2003].

Der Redoxstatus der Zelle bestimmt das Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid. DORA beschrieb 1984 auf dieser Grundlage den Zusammenhang zwischen Änderungen der NADH-Konzentration und dem intrazellularem Redoxstatus. Ein Anstieg der NADH-Konzentration weist auf eine reduzierte Zellaktivität mit vermindertem NADH-Verbrauch hin. NADH eignet sich somit ebenfalls als Indikator der metabolischen Aktivität von Zellen und Geweben [FINK et al., 1993; MAYEVSKY et al., 1984]. Die Konzentration von NADH widerspiegelt den mitochondrialen Metabolismus in vitro [KANN et al., 2003; SHUTTLEWOTH et al., 2003].

Verschiedene klinische Studien weisen auf einen positiven Effekt von peripher appliziertem reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid bei den unterschiedlichsten Symptomen und Krankheitsbildern, wie auch einer Reihe von Erkrankungen des zentralen Nervensystems hin [BIRKMAYER et al., 1989, 1990, 1993; VRECKO et al., 1993; ZHANG et al., 1998; SLADE et al., 1999; YANG et al., 2004].

Im Zusammenhang mit diesen Studien über zentral stimulierende Wirkungen von NADH stellten sich die bisher noch nicht vollständig geklärten Fragen, ob peripher verabreichtes NADH gastrointestinal resorbiert wird, die Blut-Hirnschranke passiert und letztlich die zentrale NADH- Konzentration verändern kann.

Zur Untersuchung einer möglichen intestinalen Resorption wurden bereits verschiedene *in vivo* und *in vitro* Modelle entwickelt. REX et al. nutzten beispielsweise das von WILSON und WISEMAN 1954 entwickelte everted gut sac *in vitro* Modell. Hier wird ein isoliertes Darmsegment eines Versuchstieres mit der nach außen geschlagenen, am Resorptionsprozess beteiligten Mukosa in eine Tyrode Lösung verbracht. Auf diese Weise entstehen zwei Flüssigkeitskompartimente, welche nach Versuchsende auf den Gehalt der gewünschten Substanz untersucht werden können. Es bestätigte sich hierbei die Möglichkeit einer intestinalen Resorption von NADH unter vereinfachten Bedingungen (z.B. Schutz vor Verdauungsenzymen) [REX et al., 2008].

Der selektive Nachweis von NADH im Gewebe aufgrund seiner spektroskopischen Eigenschaften ist bereits seit 1962 bekannt [CHANCE et al., 1962]. SCOTT und Mitarbeiter ermittelten 1970 die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer in wässrigen Lösungen mit 0,4 ns.

Anregung mit Licht um den Wellenlängenbereich von 340 nm erzeugt selektiv NADH-typische Fluoreszenzsignale mit einem Maximum bei 465 nm. Durch die gleichzeitige Verwendung eines spektralen und eines zeitlichen Filters kann die Laser-induzierte NADH-Fluoreszenz von der anderer Moleküle unterschieden werden [BEUTHAN et al., 1990].

Auf diesen Grundlagen konnten verschiedene Messmethoden zur Bestimmung der NADH-Fluoreszenz entwickelt werden [INCE et al., 1992; FINK et al., 1993; MAYEVSKI et al. 1996].

In unseren Untersuchungen nutzten wir die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung von NADH in Zellen und Zellverbänden *in vivo* [BEUTHAN et al., 1990; FINK et al., 1993]. Die Stärke der NADH-Fluoreszenz ist hierbei proportional zu der Konzentration der NADH-Moleküle [PFEIFER et al., 1996].

REX et al. zeigten 1999, dass mit Hilfe der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie NADH-Fluoreszenzänderungen aufgrund von metabolischen Prozessen *in vivo*, d.h. im ZNS der narkotisierten Ratte, mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung nachweisbar sind. Physiologische und pharmakologische Manipulationen können die Intensität der NADH-Fluoreszenz ändern. So führte beispielsweise die Gabe von Natriumzyanid als Atmungskettenhemmer zu einem Anstieg der gemessenen NADH-Fluoreszenz *in vivo*.

Auch GILLE und NOHL beschrieben 2000 u. a. mittels spektroskopischer und HPLC - Untersuchungen ähnliche Befunde bei der *in vitro*- Hemmung des lysosomalen NADH-Verbrauches von aufgearbeitetem Zellgewebe nach Applikation von Kaliumzyanid.

Im Rahmen von klinischen Studien wird die Wirksamkeit von peripher appliziertem NADH bei verschiedenen Krankheitsbildern beschrieben. Befürworter dieser Studienergebnisse setzen als Grundlage für eine zentrale Wirksamkeit von NADH die ZNS-Gängigkeit voraus. Bis dato existieren aber keine pharmakologischen Untersuchungen zur zentralen Verfügbarkeit von peripher verabreichtem NADH.

Es stellte sich daher die Frage, ob nach peripherer Verabreichung von NADH dieses in nachweisbaren und ggf. therapeutischen Mengen ins ZNS gelangt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war folglich die Untersuchung der zentralen Bioverfügbarkeit von NADH im ZNS der narkotisierten Ratte nach parenteraler und oraler Applikation von NADH.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchungen zeigen einen mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesenen Anstieg der kortikalen NADH-Fluoreszenz nach peripherer Applikation von NADH.

5.1. APPLIKATION VON CHLORALHYDRAT IN LETALER DOSIERUNG

Wie bereits dargestellt, sind die nachgewiesenen Intensitätsänderungen der kortikalen NADH-Fluoreszenz vergleichsweise gering. Es ist nicht bekannt, in welchem Ausmaß sich die NADH-Konzentration unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen maximal ändert. Manipulationen mit letalem Ausgang waren ein möglicher Weg zur Bestimmung der maximal möglichen Fluoreszenzänderung und erfolgten im Sinne einer Versuchskalibrierung.

Nach intraperitonealer Applikation von Chloralhydrat in einer letalen Überdosierung kam es innerhalb von 30-60 Sekunden zum Tod der Ratte und zum nachfolgenden Anstieg der gemessenen NADH-Fluoreszenz bis zu einem gemittelten Wert von ≈ 16 AU.

Dieser finale Anstieg der NADH-Fluoreszenz ist somit mit der maximal mögliche Steigerung der gemessenen Fluoreszenz gleichzusetzen (= 100%) [REX et al., 1999]. Unter unseren Versuchsbedingungen wurde dieser Wert als Maßstab der physiologischen und pharmakologischen Untersuchungen genutzt.

Die graphische Aufarbeitung der gewonnenen Daten zeigte hierbei einen charakteristischen Anstieg der gemessenen kortikalen NADH-Fluoreszenz. Dieser Anstieg war für 10 bis 15 Minuten nachweisbar.

Ca. 70% der vom Gehirn im Ruhezustand verbrauchten Gesamtenergie wird allein zur Aufrechterhaltung der physiologischen Neurotransmission verwendet [SHULMAN et al., 2004]. Beim Exitus letalis kommt es zum Erliegen der zerebralen Neurotransmission. Durch fehlenden Energie- und folglich auch fehlenden NADH- Verbrauch zeigt sich ein deutlicher Anstieg der NADH Fluoreszenz.

Die o. g. Untersuchungen von REX et al. aus dem Jahr 1999 bestätigten, dass es nach dem Tod des Versuchstieres aufgrund einer Unterbrechung der Atmungskette zum Aussetzen der NADH- Umsetzung bei ausbleibendem Energieverbrauch kommt. Bereits die Untersuchungen von MOTTIN et al. 1997 führten zu diesen Ergebnissen.

5.2. LOKALE (KORTIKALE) APPLIKATION VON NADH- UND NAD⁺-LÖSUNG

Nach Definition der maximal möglichen kortikalen NADH-Fluoreszenzänderungen soll im Anschluss der Frage nachgegangen werden, ob es durch die iatrogene Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke sowie der Blut-Liquor-Schranke, wie der Membrana gliae limitans perivascularis, zu Artefakten und falsch-positiven Ergebnissen in der NADH-Fluoreszenzmessung kommen kann.

In vorangegangenen Untersuchungen [REX et al., 1999] wurde die Messsondenspitze ausschließlich auf die Kortexoberfläche aufgesetzt. Dieses Vorgehen birgt jedoch die Gefahr, dass ggf. über Blut und Liquor ins OP-Feld gelangtes, peripher appliziertes NADH Fehlmessungen verursachen kann.

Daher wurde in unseren Untersuchungen die an einem stereotaktischen Arm befestigte Lasermesssonde ca. 2 mm im medialen, parietalen Kortex bei kontinuierlicher Messung der NADH-Fluoreszenz sowie der Streustrahlung positioniert. Dieses zum einen, um nach Erreichen der gewünschten Kortexregion die für die Messung geeignete Position (Messgröße: Fluoreszenzintensität) zu bestimmen, zum anderen um bereits während

der operativen Implantation der Messsonde iatrogene Störungen zu erkennen. Hier sei besonders auf Verunreinigungen der Messsondenspitze mit Blutpartikeln verwiesen. Dabei kann es zu einer signifikanten Verringerung des NADH-Fluoreszenz- und Streulichtsignals kommen [BEUTHAN et al., 1998; REX et al., 2001].

Ursächlich hierfür ist einerseits die mit einem Durchmesser von $2 \times 100 \mu\text{m}$ sehr kleine und daher für Verunreinigungen äußerst anfällige Sondenoptik. Weiterhin ist bedingt durch die erhebliche Fluoreszenzabsorption durch Hämoglobin eine NADH-Fluoreszenzmessung nur in weitestgehend gefäßfreien Gewebsarealen möglich [PFEIFER et al., 1996; MOTTIN et al., 1997; REX et al., 1999]. Hämoglobin absorbiert sowohl Anregungs- als auch Fluoreszenzlicht, wobei ein Unterschied bezüglich der Absorptionsspektren von Desoxy-Hämoglobin und Oxy-Hämoglobin besteht. Desoxy-Hämoglobin absorbiert vor allem Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 366 nm, Oxy-Hämoglobin absorbiert vorzugsweise das entstehende Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 460 nm [HASHIMOTO et al., 2000].

Wie im Ergebnisteil ersichtlich, hatte die lokale, d.h. direkt auf die Kortexoberfläche der Laborratte erfolgte Applikation von je $5 \mu\text{l}$ NADH⁻ und NAD⁺-Lösung in den Konzentrationen von 10^{-4} Mol/l und 10^{-5} Mol/l keine Auswirkungen auf die gemessene NADH-Fluoreszenz im Kortex.

Entweder kann NADH nicht direkt in das Hirngewebe penetrieren oder das auf die Hirnoberfläche aufgetragene NADH wird an der Oberfläche vor der möglichen Resorption oxidiert. Aufgrund der Erstbeschreibung in dieser Untersuchung lassen sich hierbei zunächst nur Vermutungen anstellen.

Unabhängig von den Ursachen kann somit die Aussage getroffen werden, dass es aufgrund iatrogenen Zerstörungen der Blut-Hirn-Schranke durch die Messsonde nicht zur Verfälschung der in diesen Untersuchungen gemessenen intrakortikalen NADH-Fluoreszenz kommt.

Es kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass Fluoreszenzänderungen nach Applikation von NADH bzw. NAD⁺ nicht aufgrund eines Kollateralkreislaufes, d.h. durch eine Blutversorgung über Nebengefäße als falsch-positive Ergebnisse zu werten waren. Es waren damit die Voraussetzungen zur Evaluation der in den nachfolgenden Versuchsreihen erhobenen Messergebnisse geschaffen.

5.3. INTRAVENÖSE APPLIKATION VON NADH- UND NAD⁺-LÖSUNG

Oral appliziertes NADH muss, um kortikale Konzentrationsänderungen zu bewirken, zwei bedeutende körpereigene Passagehindernisse überwinden. Das ist zum einen die Resorptionsschranke im Gastrointestinaltrakt mit nachfolgender Aufnahme in den Blutkreislauf und weiterhin die Passage der Blut-Hirn-Schranke.

Wir gingen in unseren Überlegungen davon aus, dass ein zentral zu messender Effekt einer peripher applizierten Substanz am ehesten nach intravenöser Gabe (durch Minimierung physiologischer Resorptions- und Stoffwechselverluste) zu verzeichnen wäre.

Die Lokalisation der Injektion ist hierbei maßgeblich für die Verteilungsgeschwindigkeit der verabreichten Substanzen im Organismus; so ist die Verteilungsgeschwindigkeit bei intrakardialen Injektionen am höchsten, gefolgt von den intravenösen, intraperitonealen, intramuskulären, subkutanen und schließlich intrakutanen Injektionsorten [BURES et al., 1983].

Wie im Abschnitt 4.3. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intravenöser Applikation dargestellt, kam es unmittelbar nach intravenöser Applikation von NADH zum raschen Anstieg der gemessenen kortikalen NADH-Fluoreszenz. Nach intravenöser Injektion von 10 mg/kg NADH-Lösung stieg die gemessene NADH-Fluoreszenz in Relation zu den mit Natriumbikarbonat behandelten Ratten auf 14,8 % des Fluoreszenzmaximums. Dieser positive Effekt war für ca. 4 Minuten nachweisbar.

Nach intravenöser Applikation der fünffachen Dosis NADH (50 mg/kg KG) kam es zu einer Verstärkung des Fluoreszenzmaximums auf 18,3 %, sowie zu einer Verlängerung der Dauer der erhöhten Fluoreszenz auf ca. 9 Minuten.

In weiteren Überlegungen stellte sich die Frage, ob diese nachweisbare Verstärkung der zentralen NADH-Fluoreszenz ggf. allein aus einer temporären intravaskulären Konzentrationserhöhung der das Hirngewebe versorgenden Blutgefäße resultiert.

Wie bereits oben angeführt, kann diese Theorie jedoch leicht entkräftet werden. Es besteht Klarheit darüber, das Hämoglobin sowohl das anregende Licht der Laserimpulse, als auch die eigentliche NADH-Fluoreszenz fast vollständig absorbiert [REX et al., 1999, 2001].

Ein weiteres Faktum spricht gegen einen ausschließlich intravasalen Konzentrationsanstieg von NADH. Bei der intravenösen Applikation wurde lediglich die Dosis von NADH (10 und 50 mg/kg KG) variiert. Das Applikationsvolumen blieb mit 1 ml/kg KG jeweils identisch. Bei einer auf die Gefäße beschränkten Konzentrationssteigerung von NADH wäre nur die Fluoreszenzintensität bei gleich bleibender Fluoreszenzdauer erhöht, da sich Injektionsvolumen und Blutströmungsgeschwindigkeit und somit die Verweildauer von NADH -haltigem Blut unter der Messsonde nicht verändern.

In den vorliegenden Messergebnissen stellt sich im Gegensatz eine Prolongierung der nachweisbaren Fluoreszenzerhöhung bei weitestgehend unveränderter Fluoreszenzintensität dar.

Betrachtet man den unmittelbar nach i.v.- Applikation von NADH grafisch dargestellten Kurvenverlauf in Abbildung 13 ist es wahrscheinlich, dass intravenös appliziertes NADH die Blut-Hirn-Schranke passiert und eine Verstärkung der NADH-Fluoreszenz im Kortex der Ratte bewirkt.

NAD⁺ intravenös appliziert, bewirkt – wider Erwarten - ebenfalls einen deutlichen Anstieg der nachweisbaren NADH-Fluoreszenz im Rattenkortex. Geht man von einem Steady state zwischen dem oxidierten, energiearmen NAD⁺ und dem reduzierten, höherenergetischen NADH aus [v. BRUCHHAUSEN, EBEL, 1993], könnte ein Überschuss an NAD⁺ eine verstärkte Reduktion des Nicotinamid-adenin-dinucleotid zu NADH und somit eine Erhöhung der kortikalen NADH-Fluoreszenz bewirken [LIN et al., 2003].

Aus Voruntersuchungen von KLAIDMAN et al. im Jahr 2001 ist ein ausbleibender Effekt von intravenös appliziertem Nicotinsäureamid bekannt. Aus diesem Grund wurde in unseren Untersuchungen bewusst auf die intravenöse Applikation von Nicotinsäureamid bei den Versuchstieren verzichtet.

5.4. INTRAPERITONEALE APPLIKATION VON NADH-, NAD⁺ - UND NICOTINAMID-LÖSUNG

Die intraperitoneale Applikation ist in der experimentellen Pharmakologie bei Nagern ein Standardverfahren. Durch die große Oberfläche und die gute Durchblutung des

Peritonealepithels ist die Aufnahmefähigkeit für membrangängige Substanzen sehr gut. Eine in die Bauchhöhle injizierte Substanz verteilt sich, durch die Darmbewegungen gefördert, schnell über das Peritoneum und wird deshalb schnell resorbiert. Bei der intraperitonealen Injektion werden Beeinflussungen durch Enzyme des Verdauungstraktes und Vermischungen des Arzneimittels mit Bestandteilen des Milieu extérieur vermieden. Die intraperitoneale Injektion sichert eine rasche und reproduzierbare Resorption.

Die Injektion in die Bauchhöhle ist vor allem bei den kleinen Tierarten (Maus, Ratte, Meerschweinchen) von Bedeutung, bei denen die intravenöse Verabreichung Schwierigkeiten bereitet [BURES et al., 1983].

Ebenso werden auf diesem Wege Verluste der zu messenden Wirksubstanz bei der gastroenteralen Resorption sowie durch enzymatischen Abbau in der Darmmukosa vermieden.

Somit stellt die intraperitoneale Applikation die bei Nagern im Rahmen von pharmakologischen Versuchen gebräuchlichste Form der Verabreichung von Testsubstanzen dar [SCHELER et al., 1989].

U. a. diese Prinzipien nutzend, findet der transperitoneale Stoffaustausch auch in der Humanmedizin seine Anwendung. Im Rahmen der Peritonealdialyse wird ein steriles Dialysat in die freie Bauchhöhle appliziert. Harnpflichtige Substanzen und andere Stoffwechselendprodukte können bei einem entsprechenden Konzentrationsgefälle durch transperitoneale Diffusion dem Körper entzogen werden [PSCHYREMBEL, 1998].

Wie im Abschnitt 4.4.1. Veränderung der NADH-Fluoreszenz nach intraperitonealer Applikation von NADH-Lösung ersichtlich, kam es nach Gabe von NADH-Lösung in der Konzentration 10 mg/kg über die gesamte Messdauer zu keiner signifikanten Erhöhung der kortikalen NADH-Fluoreszenz.

Nach Verabreichung von 50 mg/kg NADH intraperitoneal stieg die nachweisbare NADH-Fluoreszenz im Rattenkortex gegenüber der Natriumbikarbonat-Kontrollkurve auf 21,2 % des Fluoreszenzmaximums. Dieser positive Effekt war für ca. 30 Minuten messbar.

Sowohl NAD⁺ in den Dosierungen 10 und 50 mg/kg als auch Nicotinamid in den gleichen Konzentrationen (10 und 50 mg/kg) zeigten in diesem Versuch keine Veränderungen der NADH-Fluoreszenz im Kortex der Laborratte.

Der hier im Gegensatz zur intravenösen Applikation ausbleibende Effekt des verabreichten NAD^+ ist möglicherweise durch die erschwerte Resorption der positiv geladenen NAD^+ - Moleküle bedingt.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen belegte KLAIDMAN et al. im Jahr 2001 eine ausbleibende Konzentrationsänderung von NADH im Kortex des Versuchstieres nach einmaliger Gabe von 500 mg/kg Nicotinsäureamid intraperitoneal, welches laut FACHINFO [CD-ROM des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie, 1998] rasch und vollständig resorbiert wird. Ein Grund für die Wirkungslosigkeit in unseren Untersuchungen kann in der kurzen Vorbehandlungszeit liegen. In einer vorangehenden Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass Nicotinamid nach 13 Stunden die Konzentration von NAD^+ im ZNS erhöht [KLAIDMAN et al., 1996]. Möglicherweise stimuliert die längerfristige Gabe von Nicotinsäureamid die Synthese von NADH, wissenschaftliche Arbeiten hierzu waren jedoch nicht verfügbar.

Zusammenfassend kann von einer intraperitonealen Resorption von NADH ausgegangen werden. Offensichtlich bedarf es jedoch einer individuellen Mindestdosis an NADH, um positive Effekte bei der NADH-Fluoreszenzmessung zu bewirken. Die vorab festgelegten, somit standardisierten Dosierungen von jeweils 10 und 50 mg/kg Körpergewicht, lassen hier den Schwellenwert nicht deutlich werden. Es müssten weitere Untersuchungen zu einer Dosis-Wirkungsbeziehung durchgeführt werden.

Hinweise auf eine stattfindende Resorption von NADH wurden auch in der von REX et al. 2004 vorgelegten Studie bezüglich einer zentral vermittelten, antidepressiven Wirkung von NADH durch Verhaltensversuche an Ratten im Forced Swim Test bestätigt. NADH wurde hier 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 z. B. Fluoxetin.

Weiterführende Untersuchungen sind angezeigt und müssen auch Auskunft darüber geben, ob eine weitere Erhöhung der NADH-Konzentration eine Veränderung der Nachweisdauer (> 30 Minuten) nach sich zieht.

5.5. ORALE APPLIKATION VON NADH UND NICOTINAMID

BIRKMAYER ließ sich 1994 erstmals NADH in seiner stabilisierten und absorptionsfähigen Form (ENADA[®]) für die orale Applikation patentieren. NADH wird u. a. als Parkinsontherapeutikum in den USA vermarktet.

In der Literatur finden sich verschiedene klinische Studien, in welchen NADH mit positiven Ergebnissen oral verabreicht wurde [BIRKMAYER et al., 1991 und 1993; BUSHARI et al., 1998; Forsyth et al., 1999; Grathwohl et al., 2000].

Die orale Wirkstoffgabe genießt u. a. aufgrund der vergleichsweise geringen psychischen Belastung des Patienten die höchste Compliancerate. Somit als Standardapplikationsart schloss diese Arbeit mit einer Versuchsreihe zur Veränderung der kortikalen NADH-Fluoreszenz nach oraler Gabe.

In unseren Untersuchungen wurden den Versuchstieren jeweils zwei Tabletten ENADA[®] (NADH) á 5 mg oral appliziert. Das entspricht einer durchschnittlichen Dosierung von $51,1 \pm 1,1$ mg/kg. Nach einer anfänglichen Steigerung der gemessenen kortikalen NADH-Fluoreszenz ergab sich im weiteren Verlauf der Untersuchung keine Änderung der nachweisbaren NADH-Fluoreszenz zur Kontrollgruppe mit Placebo-tabletten.

Die statistische Analyse der Daten zu Beginn der jeweiligen Messungen nach oraler Applikation von NADH zeigte jedoch eine signifikante Erhöhung der NADH-Fluoreszenzwerte (siehe Abbildung 20).

Es kann somit vermutet werden, dass oral appliziertes NADH gastrointestinal resorbiert wird und einen zentral nachweisbaren Effekt im Sinne einer Erhöhung der NADH-Fluoreszenz im Kortex bewirkt.

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch weitere *in vitro* Untersuchungen, bei denen eine, wenn auch nur geringe Resorption im Dünndarm nachgewiesen wurde [REX et al., 2005, 2008].

NADH- Dosierungen, welche sowohl bei intravenöser als auch bei intraperitonealer Verabreichung messbare Veränderungen der kortikalen Fluoreszenz bewirkt hatten, zeigten nach oraler Gabe keinen den Ergebnissen der anderen Applikationsformen adäquaten Effekt.

Vor diesem Hintergrund müssen verschiedene Überlegungen angestellt werden. Zum einen sollte bedacht werden, dass die intestinale Resorption eines Arzneimittels besonders sowohl durch die Molekülgröße und die elektrische Ladung, als auch die Wasser- bzw. Fettlöslichkeit der Substanz beeinflusst wird. Eine große Molekülmasse (> 400 Dalton) und eine schlechte Löslichkeit wirken sich negativ auf die Resorption aus [RAPOPORT, 1975]. Die Molekülgröße von NADH beträgt 665,4 Dalton [K. NADLINGER, Birkmayer Labor] und liegt damit über der o. g. Grenze der Permeabilität der tight junctions, welche die einzelnen Zellen der intestinalen Barriere miteinander verbinden. NADH ist jedoch hygroskopisch und gut wasserlöslich und könnte daher die Blut- / Hirnschranke passieren bzw. resorbiert werden. Daten zum Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizient existieren laut Herrn Dr. NADLINGER, Direktor für Forschung und Entwicklung, Birkmayer Labor, Wien bisher nicht.

Weiterhin haben Verdauungsenzyme im Gastrointestinaltrakt Einfluss auf die Substanzen. Es können Resorptionsverluste im Verdauungstrakt eine Reduktion der Bioverfügbarkeit bewirken. Desgleichen ist der bei der oralen (sowie intraperitonealen) Gabe verstärkte metabolische Abbau von Arzneistoffen bei Passage u. a. der Leber (Fist-pass-Effekt) und der Darmschleimhaut zu berücksichtigen [FORTH, HENSCHLER, 1996].

Letztlich muss auch bedacht werden, dass zwischen der oralen Applikation der ENADA[®]-Tabletten und der ersten Messung der NADH-Fluoreszenz eine Zeitspanne von ca. 60 Minuten lag, in der eine eventuelle Änderung der kortikalen NADH-Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Dieses Intervall ist hauptsächlich durch die erforderliche Zeit bis zum Erreichen der notwendigen Narkosetiefe als auch durch die sich anschließenden Operation der Ratte bedingt.

Bei der vermuteten geringen Resorption von oral appliziertem NADH ist auch an eine bis zum Messbeginn weitestgehend vollständige Verstoffwechslung von NADH und einen entsprechenden Verlust der nachweisbaren Fluoreszenz zu denken.

Konsequenterweise musste natürlich auch die Frage gestellt werden, ob der in Tablettenform verabreichte Wirkstoff überhaupt bis in den Magen-Darm-Trakt gelangte, um hier resorbiert zu werden. Aus diesem Grund schlossen wir nach finaler Narkose des Versuchstieres eine Sektion mit vorausgehender Inspektion des Rachenraumes an. Im Rahmen dieser Untersuchungen fanden sich keine makroskopisch nachweisbaren

Tablettenbestandteile im inspizierten Verdauungstrakt. Es muss jedoch auch bemerkt werden, dass sich zum Zeitpunkt der Untersuchung jeweils größere Mengen an Nahrungsbrei im Magen des Tieres fanden. Es ist daher davon auszugehen, dass Anteile der Testsubstanz bis zum Versuchsende einer Resorption nicht zugänglich waren.

In nachfolgenden tierexperimentellen Arbeiten sollte daher über eine der Untersuchung vorangehende Nahrungskarenz der Laborratten nachgedacht werden.

Ebenso wurde oral appliziertes Nicotinamid in der gleichen Dosierung wie NADH untersucht. Es zeigte sich in dieser Versuchsreihe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten NADH- Fluoreszenzerhöhungen, was darauf hinweist, dass eine periphere Gabe des NADH – Vorläufers Nicotinamid nicht zu einer schnelleren Synthese von NADH führt.

5.6. SCHLUSSBETRACHTUNG

Verschiedene klinische Studien beschreiben die Wirksamkeit von peripher appliziertem NADH bei verschiedenen Krankheitsbildern, wobei als Grundlage für eine zentrale Wirksamkeit von NADH die ZNS- Gängigkeit vorausgesetzt wird. Bis dato existieren aber keine pharmakologischen Untersuchungen zur zentralen Verfügbarkeit von peripher verabreichtem NADH.

Ziel unserer Arbeit war die Untersuchung der zentralen Bioverfügbarkeit von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid im ZNS der narkotisierten Ratte mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie nach parenteraler und oraler Applikation.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen bei intravenöser und höherdosierter intra-peritonealer Applikation von NADH einen deutlichen Anstieg der gemessenen kortikalen NADH-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Natriumbicarbonat. Bei der oralen Applikation von ENADA[®] (NADH) wird zu Beginn der Messung eine signifikante Fluoreszenzerhöhung deutlich.

Es ist daher zu vermuten, dass parenteral und oral verabreichtes NADH vom Organismus des Versuchstieres resorbiert wird, bei entsprechend hoher systemischer

Konzentration die Blut-Hirn-Schranke überwinden und klinisch nachweisbare Reaktionen im Zentralen Nervensystem hervorrufen kann.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen damit im Einklang zu den eingangs genannten Studien bei Patienten u.a. mit Parkinson-Syndrom [BIRKMAYER et al., 1989/1990/1993; VRECKO et al., 1993], Formen der Depression [BIRKMAYER et al., 1991] und Chronischem Ermüdungssyndrom [FORSYTH et al., 1999].

Es ist hierbei jedoch schwierig, von den beim Versuchstier benötigten Wirkstoffmengen an NADH Rückschlüsse auf die beim Menschen erforderlichen Konzentrationen zu ziehen. So zeigt sich beispielsweise die anxiolytische Wirkung von Diazepam bei der Laborratte bei der Behandlung mit ca. 4,0 mg/kg KG, beim Menschen liegen bereits Gesamtdosierungen von 5,0 – 10 mg Diazepam im therapeutischen Bereich [BERT et al., 2001]. Spekulativ bleibt somit, ob die von uns verwendeten Dosierungen bei der Laborratte auch in Relation auf den Menschen zur Anwendung kommen könnten.

Ungeklärt ist weiterhin, ob tatsächlich die applizierten NADH-Moleküle mittels der bei dieser Untersuchung verwandten Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen wurden, oder ob es beispielsweise durch die Erhöhung der peripheren NADH-Konzentration zur Verschiebung des Laktat/Pyruvat-Verhältnisses kommt. Der Abbau von Glukose in der Glykolyse führt zum Zwischenprodukt Pyruvat. Laktat steht mit Pyruvat im biochemischen Gleichgewicht (Laktat-Dehydrogenase-Reaktion). Diese reversible Reaktion führt zu einem steady state zwischen Laktat und Pyruvat zugunsten von Laktat. Das Laktat/Pyruvat-Verhältnis beträgt normalerweise $\leq 10:1$. Bei ausreichendem Sauerstoffangebot wird Pyruvat in den Mitochondrien im Krebszyklus weiter verstoffwechselt [Lance et al., 1985].

Bekanntermaßen sind Laktat und Pyruvat durchaus in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und könnten so zum Anstieg der NADH-Konzentration im ZNS beitragen.

Untersuchungen mit radioaktiv markierten NADH-Molekülen wären ein möglicher Weg zur Klärung dieser Frage.

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass zur zentralnervösen Energiegewinnung Glukose Verwendung findet. Durch Bestimmung der NADH Fluoreszenz wurde festgestellt, dass Laktat, v. a. in Astrozyten, möglicherweise auch als Energiequelle genutzt wird [PELLERIN et al., 2004].

Nach der intravenösen Applikation von NAD^+ kam es sowohl bei einer Dosierung von 10 als auch 50 mg/kg KG zu einem deutlichen Anstieg der gemessenen NADH-Fluoreszenz. Geht man von einem steady state zwischen dem oxidierten NAD^+ und dem reduzierten NADH aus, könnte ein durch Applikation von NAD^+ hervorgerufenes Ungleichgewicht zu einer vermehrten Reduktion zu NADH führen [BARRON et al., 2000]. NAD^+ intraperitoneal appliziert, bewirkte jedoch keine nachweisbare NADH-Fluoreszenzänderung im Kortex der Ratte.

Nicotinamid intraperitoneal und oral appliziert zeigte ebenfalls keine Änderungen der zentralen NADH-Fluoreszenz. Nicotinamid ist die Vorstufe in der Synthese von NADH. STRADFORD et al. wiesen 1996 eine rasche und vollständige Resorption nach oraler Gabe von Nicotinsäureamid nach. Die Gabe von Nicotinamid hätte hypothetisch zu einer vermehrten Synthese von NADH führen können, sodass eine erhöhte kortikale NADH-Fluoreszenz nachweisbar gewesen wäre. In unseren Untersuchungen konnten wir keine Veränderungen der NADH-Fluoreszenz nach Verabreichung von Nicotinamid feststellen. Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den Untersuchungen von KLAIDMAN et al. (2001) nach einmaliger Gabe von Nicotinamid. Zu vermuten ist hier der Umstand, dass aufgrund der längeren Synthesedauer von Nicotinamid zu NADH nach einmaliger Applikation und relativ kurzem Untersuchungszeitraum keine Änderung der zentralen NADH-Konzentration nachweisbar war. In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, ob durch eine Dauerapplikation von Nicotinamid die NADH-Synthese stimuliert und somit eine Erhöhung der kortikalen NADH-Fluoreszenz nachgewiesen werden könnte.

Reliable Untersuchungsergebnisse sind die Grundlage jeder wissenschaftlichen Studie. INCE et al. beschrieben 1992 u.a. den Einfluss von Änderungen der Laserleistung, von hämodynamischen Effekten und Eigenbewegungen des Versuchstieres auf die Messung der NADH-Fluoreszenz *in vivo*. Aus diesem Grund waren vor Versuchsbeginn folgende Überlegungen notwendig:

Um Artefakte aufgrund von differierenden Laserenergieleistungen und einer daraus resultierenden unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der NADH-Moleküle auszuschließen, wurde die gemessene NADH-Fluoreszenz stets in Relation zur aktuellen Laserenergie berechnet.

Hämodynamisch bedingte Veränderungen der gemessenen NADH-Fluoreszenz waren bei unserer Untersuchung vernachlässigbar, da Messungen ausschließlich intrakortikal in gefäßfreien bzw. gefäßarmen Arealen durchgeführt wurden.

Eigen- bzw. Atembewegungen des Versuchstieres im Bereich der Messsondenspitze wurden zum einen durch eine suffiziente Narkose und zum anderen durch die Fixierung des Rattenkopfes im stereotaktischen Gerät (David Kopf, USA) minimiert bzw. verhindert.

Von Bedeutung ist ebenfalls die Tatsache, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche stets an narkotisierten Versuchstieren mit reduzierter Stoffwechselaktivität und somit vermindertem NADH- Verbrauch durchgeführt wurden. Messungen an wachen, frei beweglichen Tieren sind prinzipiell möglich. Eine entsprechende experimentelle Anordnung ist in Planung.

Kritische Stimmen sprechen sich jedoch vehement gegen die Wirksamkeit von NADH in Bezug auf einen positiven Effekt beispielsweise bei Depressiven oder Parkinsonpatienten in den eingangs beschriebenen klinischen Studien aus. SWERDLOW et al. sehen zum Passieren der Blut-Hirnschranke wesentlich höhere Dosen (ca. 500-fach) als erforderlich an. Ebenfalls wird das Fehlen von eindeutig den Benefit für den Patienten belegenden placebokontrollierten klinischen Studien kritisiert.

GSELL et al. sehen eine Stimulation der Dopaminsynthese bei Morbus Alzheimer nicht als essentiell, da Dopamin im Gegensatz zu serotonergen, GABAergen und cholinergen Systemen in der Pathogenese nur gering betroffen sei.

JELLINGER nimmt u. a. dieses zum Anlass, aufgrund von mangelnden oder fehlenden experimentellen bzw. unzureichend klinisch dokumentierten Befunden Empfehlungen für die therapeutische Anwendung von NADH bei Alzheimerpatienten als deutlich verfrüht anzusehen und warnt vor einer unkontrollierten Verabreichung.

Nach unseren Ergebnissen und unter Berücksichtigung vorangegangener tierexperimenteller Verhaltensuntersuchungen ist es nicht auszuschließen, dass peripher appliziertes NADH das ZNS erreicht und hier klinisch nachweisbare Effekte auslösen kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Nicotinamidnucleotide NAD^+ und NADH zählen zu den erstentdeckten Coenzymen. Sie übertragen als Redox-Coenzym in den Mitochondrien Wasserstoff, der zur Energiegewinnung in der Atmungskette genutzt wird.

Bei Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) wie dem Morbus Parkinson, der endogenen Depression und dem Chronischen Ermüdungssyndrom werden therapeutische Effekte von systemisch appliziertem reduzierten Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) beschrieben. Es ist jedoch nicht bekannt, ob peripher verabreichtes NADH resorbiert wird, die Blut-Hirnschranke überwindet und schließlich die Konzentration von NADH im ZNS ändert.

Wir untersuchten Aspekte der zentralen Bioverfügbarkeit von NADH im ZNS der narkotisierten Ratte nach lokaler, parenteraler und oraler Applikation von NADH mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie.

Zur Bestimmung von NADH im Kortex wurde die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie genutzt. Über eine Glasfasersonde werden Laserimpulse in den Kortex geleitet und Fluoreszenzen induziert, die mittels einer zweiten Glasfaser zu dem Detektor zurückgeleitet werden. NAD^+ und NADH besitzen unterschiedliche Absorptionsspektren: NADH , aber nicht NAD^+ absorbiert Licht bei $\lambda=340$ nm. Anregung mit Licht um den Wellenlängenbereich von 340 nm erzeugt selektiv NADH -Fluoreszenzsignale mit einem Maximum bei 465 nm. Zusätzliche spektrale und zeitliche Filter ermöglichen die selektive Isolierung der NADH Fluoreszenz.

Die lokale Gabe von NADH - oder von NAD^+ -Lösung auf die Kortexoberfläche direkt neben die implantierte Lasersonde änderte die NADH -Fluoreszenz im Kortex der Versuchstiere nicht. Die iatrogene Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke durch die Lasersonde führte zu keinen falsch-positiven Artefakten in der NADH -Fluoreszenz im Kortex.

Nach intravenöser Gabe von NADH (10 und 50 mg/kg KG) kam es zu einem deutlichen und dosisabhängigen Anstieg der kortikalen NADH -Fluoreszenz. Auch nach intravenösen Applikation von NAD^+ war die kortikale NADH -Fluoreszenz erhöht, was auf ein Fließgleichgewicht zwischen NADH und NAD^+ hinweist.

Nach intraperitonealer Applikation von NADH (50 mg/kg KG) war eine temporäre Erhöhung der kortikalen NADH-Fluoreszenz nachweisbar. Bei der Gabe von NAD⁺- und Nicotinamidlösungen änderte sich die kortikale NADH-Fluoreszenz nicht.

Eine orale Gabe des tablettierte Wirkstoffes NADH (ENADA[®]) erhöhte, im Vergleich zu einer Behandlung mit Nicotinamid oder Vehikel, die Intensität der kortikalen NADH-Fluoreszenz zu Beginn der Messungen.

Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) nach parenteraler und oraler Applikation bei Ratten resorbiert werden kann und es zu einer temporären Erhöhung der NADH-Konzentration im ZNS kommt, wobei ungeklärt ist, ob tatsächlich auch die peripher applizierten NADH-Moleküle im Kortex nachgewiesen wurden und somit unmittelbar für die zentralen NADH-Fluoreszenzerhöhungen verantwortlich sind. NAD⁺ und Nicotinamid haben nach einmaliger intraperitonealer oder oraler Gabe keine Auswirkung auf die cerebrale NADH-Konzentration.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D.
Energieumwandlung: Mitochondrien und Chloroplasten, in: Molekularbiologie der Zelle (Original: Molecular biology of the cell, Third edition). JAENICKE L. (ed.), 771-851 (1995)
2. AMES A.
CNS ENERGY METABOLISM AS RELATED TO FUNCTION.
Brain Research Reviews 34, 42-68 (2000)
3. AUTERHOFF H., KNABE J., HÖLTJE H.-D.
Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie 715-718 (1994)
4. BARRON J.T., GU L., PARILLO J.E.
NADH/NAD redox state of cytoplasmic glycolytic compartments in vascular smooth muscle.
Am J Physiol Heart Circ Physiol Dec 279:6, H2872-8 (2000)
5. BERGMAYER H. U.
Methoden der enzymatischen Analyse 2094-2122 (1974)
6. BERT B., FINK H., SOHR R., REX A.
Different effects of diazepam in Fischer rats and two stocks of Wistar rats in tests of anxiety
Pharmacology Biochemistry & Behavior, 70, 411-420 (2001)
7. BEUTHAN J., ZUR C., FINK F., MÜLLER G.
Laser fluorescence spectroscopic experiments for metabolism monitoring.
Laser Med. Surg. 6, 72-75 (1990)
8. BEUTHAN J., ZUR CH., MÜLLER G., HOFMANN H.
Ein experimenteller Beitrag zur Messwertskalierung bei in vivo Laserfluoreszenzspektroskopie.
Laser Med Surg. 6, 127-130 (1990)

9. BIRKMAYER GJD., BIRKMAYER W.
Stimulation of endogenous L-dopa biosynthesis – a new principle for the therapy of Parkinson's disease.
Acta Neurol. Scand.126, 183-187 (1989)
10. BIRKMAYER JGD., VRECKO C., BIRKMAYER W.
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 (1993)
11. BIRKMAYER W., BIRKMAYER JGD.
The coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) as biological antidepressive agent.
New Trends in Clin Neuropharmacol V-n, 19-25 (1991)
12. BIRKMAYER W., BIRKMAYER JGD., VRECKO C., PALETTA B., RESCHENHOFER E., OTT E.
Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) as Medication for Parkinson's Disease. Experience with 415 Patients.
New Trends in Clin Neuropharmacol IV, 1 7-24 (1990)
13. v. BRUCHHAUSEN F., EBEL S.
Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis 1058-1059 (1993)
14. BURES J., BURESOVA O., HUSTON JP.
Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior.
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam-New York (1983)
15. BUSERI N., JARRELL T., LIEBERMAN S., MIRDAMADI-ZONOZI N., BIRKMAYER G., PREUSS
Oral reduced B-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) affects blood pressure, lipid peroxidation and lipid profile in hypertensive rats (SHR).
Geriatric Nephrology and Urology 8, 95-100 (1998)
16. BYRNE E.
Does mitochondrial respiratory chain dysfunction have a role in common neurodegenerative disorders?
Journal of Clinical Neuroscience, 9 (5), 497-501 (2002)

17. CHANCE B., COHEN P., JÖBSIS F., SCHOENER B.
Intracellular oxidation-reduction states in vivo.
Science 137, 499-507 (1962)
18. DE DUVE A.
Die Zelle, Band 1 (Original: A Guided Tour of The Living Cell), 97-161 (1992)
19. DORA E., GYULAI L., KOVACH A.G.
Determinants of brain activation-induced cortical NAD/NADH response in vivo.
Brain Res. 229, 61-72 (1984)
20. ENG J., LYNCH R. M., BALABAN R. S.
Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes.
Biophys. J. 55, 621-630 (1989)
21. ERECINSKA M., WILSON DF.
Regulation of cellular energy metabolism.
J. Membrane Biol., 70, 1-14 (1982)
22. FACHINFO - ARZNEIMITTEL
Nicotinsäureamid 200 mg JENAPHARM®, Jenapharm GmbH & Co. KG
CD-ROM des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie, Aulendorf ECV (1998)
23. FINK F., PAUL R., PFARRHERR A.
Laser fluorescence spectroscopic experiments for monitoring molecules in brain.
In: Optical Imaging of Brain Function and Metabolism. Dirnagl, U. (Ed.)
Plenum Press. New York, 233-243 (1993)
24. FORSYTH L.M., PREUSS H., MACDOWELL A.
Therapeutic effects of oral NADH on the symptoms of patients with chronic fatigue syndrome.
Ann Allergy Asthma Immunol 82, 185-191 (1999)
25. FORTH W., HENSCHLER D.
Pharmakologie und Toxikologie 651-652 (1996)

26. FRIEBOLIN H.
Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH, Weinheim, 3. Edition (1999)
27. GILLE L., NOHL H.
The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone.
Arch Biochem. Biophys. 375, 347-354 (2000)
28. GRATHWOHL D., KLANN M., MÜLLER HM., SCHLACHTER H., BERG A.
Einfluss einer NADH-Supplementation auf die muskuläre Energiebereitstellung beim Menschen. Postervortrag beim Kongress „Herz 2000-Strategien zur optimierten Sekundärprävention“
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 11/2000 (2000)
29. GSELL W., STREIN I., RIEDERER P
The neurochemistry of Alzheimer type, vascular type and mixed type dementias compared.
J Neural Transm (Suppl) 47, 73-101 (1996)
30. GYULAI L., DORA E., KOVACH A.
NAD / NADH: redox state changes on cat brain cortex during stimulation and hypercapnia.
Am J Physiol 243:4, 619-627 (1982)
31. HATEFI Y.
The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system.
Annu. Rev. Biochem. 54, 1015-1069 (1985)
32. HOLLAS JM.
Moderne Methoden in der Spektroskopie.
Vieweg Lehrbuch Physikalische Chemie (1995)
33. INCE C., COREMANS JM., BRUINING HA.
In vivo NADH fluorescence. Adv Exp Med Biol 317, 277-296 (1992)

34. JASON LA., RICHMAN JA., RADEMARKER AW.
A community-based study of chronic fatigue syndrome.
Arch Intern Med 159, 2129-2137 (1999)
35. JELLINGER KA.
NADH (Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid) und M. Alzheimer
Neuropsychiatrie 13, 85-87 (1999)
36. KANN O., SCHUCHMANN S., BUCHHEIM K., HEINEMANN U.
Coupling of neuronal activity and mitochondrial metabolism as revealed by NAD(P)H
fluorescence signals in organotypic hippocampal slice cultures of the rat
Neuroscience 119, 87-100 (2003)
37. KLAIDMAN L.K., MUKHERJEE S.K., ADAMS J.D.,
Oxidative changes in brain pyridine nucleotides and neuroprotection using nicotinamide.
Biochem. Biophys. Acta, 1525, 136-148 (2001)
38. KLAIDMAN L., LEUNG A., ADAMS J.
High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Oxidized and Reduced Pyridine
Dinucleotides in Specific Brain Regions
Analytical Biochemistry , 228 312-317 (1995)
39. KÖNIG F.
Die Bedeutung der Laserinduzierten Autofluoreszenz für die Früherkennung des Harn-
blasenkarzinoms.
Dissertation am Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin (1995)
40. KREUTZIG TH.
Biochemie, 204-205 (1977)
41. LAKOWICZ JR., SZMACINSKI H., NOWACZYK K., JOHNSON ML.
Fluorescence lifetime imaging of free and protein bound NADH.
Proc Natl Acad Sci USA 89, 1271-1275 (1992)

42. LANCE C., CHAUVEAU M., DIZENGREMEL P.
The cyanide-resistant pathway of plant mitochondria.
Encyclopedia of plant Physiology, New Series, Vol. 18, Eds: DOUCE & DAY, SPRINGER
VERLAG BERLIN, 202-247 (1985)

43. LAWRIE SM., ANDERS N., GEDDES JR., PELOSI AJ.
A population-based incidence study of chronic fatigue.
Psychol Med 27, 343-353 (1997)

44. LIN S-J., GUARENTE L.
Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and
disease
Current Opinion in Cell Biology, 15: 241-246 (2003)

45. LOHMANN W., MUSSMANN J., LOHMANN C., KUNZEL W.
Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma.
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 31, 249-253 (1989)

46. LOWRY O.H., ROBERTS N.R., KAPPAHN J.I.
J. Biol. Chem. 224, 1047 (1957)

47. MAHLER H., CORDES E.
Biological Chemistry. Second Edition, Harper International Edition 409-414 (1971)

48. MAYEVSKI A., DORON A., MANOR T., MEILIN S., ZARCHIN N., OUAKNINE GE.
Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric
monitoring system.
Brain Research, 740, 268-274 (1996)

49. MCCORMICK DB., SUTTIE JW., WAGNER C.
Methods in Enzymology. Vol. 280, Vitamins and Coenzymes, Part J,
Academic Press (1997)

50. MICHAL G.
Methodicum Chemicum Bd.1/2 (1973)

51. MITCHELL P.
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.
Nature 191, 144-191 (1961)
52. MOTTIN S., LAPORTE P., JOUVET M., CESPUGLIO R.
Determination of NADH in the rat brain during sleep-wake states with an optic fibre sensor and time-resolved fluorescence procedures.
Neuroscience 79, No. 3, 683-693 (1997)
53. MOTTIN S., LAPORTE P., CESPUGLIO R.
Inhibition of NADH oxidation by chloramphenicol in the freely moving rat measured by picosecond time-resolved emission spectroscopy.
Neuroscience 84, 633-642 (2003)
54. MUTSCHLER E., SCHÄFER-KORTING M.
Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 7. Auflage (1996)
55. NICHOL CA., SMITH GK., DUCH DS.
Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin.
Ann Rev Biochem. 54, 729-764 (1985)
56. OMACHI A., SCOTT CB., HEGARTY H.
Bioch. Biophys. Acta, 184, 139-148 (1969)
57. PAXINOS G., WATSON C.
The rat brain in stereotactic coordinates. Academic Press, New York, 1998
58. PFEIFER L., PAUL R., YALCIN E., MARX U., KÖNIG F., FINK F.
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 Tenerife/Spain; University of La Laguna, 42-43 (1996)

59. RAPOPORT S.M.
Medizinische Biochemie. Verlag Volk und Gesundheit; 4. Auflage (1975)
60. REITZ M.
Mitochondrien - mehr als Energielieferanten
Pharm. Ind. 64, Nr. 4, 73-75 (2002)
61. REX A., FINK H.
Effects of 8-OH-DPAT on hippocampal NADH fluorescence in vivo in anaesthetised rats
J of Neuroscience Research (2005)
62. REX A., FINK H.
Pharmakokinetic aspects of reduced nicotinamide adenin dinucleotide (NADH) in rats
Frontiers in Bioscience 13, 3735-3741 (2008)
63. REX A., HENTSCHE M.-P., FINK H.
Bioavailability of reduced Nicotinamide-adenin-dinucleotide (NADH) in the Central Nervous System of the Anaesthetized Rat Measured by Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy.
Pharmacology & Toxicology, 90, 220-225 (2002)
64. REX A., PFEIFER L., FINK F., FINK H.
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 (1999)
65. REX A., PFEIFER L., FINK H.
Determination of NADH in frozen rat brain sections by laser-induced fluorescence.
Biol Chem 382, 1727-32 (2001)
66. REX A., SPYCHALLA M., FINK H.
Treatment with reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) improves water maze performance in old Wistar rats
Behavioural Brain Research 154, 149-153 (2004)

67. REX A., SCHICKERT R., FINK H.
Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swim test in rats
Pharmacology, Biochemistry and Behavior 77, 303-307 (2004)

68. RIEPE MW., SCHMALZIGAUG K., FINK F., OEXLE K., LUDOLPH A.
NADH in the pyramidal cell layer of hippocampal regions CA1 and CA3 upon selective inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation.
Brain Research, 710, 21-27 (1996)

69. Roche Lexikon Medizin, 4., neubearbeitete und erweiterte Auflage
Verlag Urban & Fischer

70. ROVER L JR., FERNANDES JCB., DE OLIVEIRA NETO G. ET AL.
Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design.
Anal Biochem 260, 50-55 (1998)

71. RÜCKER G., NEUBAUER M., WILLEMS G.G.
Instrumentelle pharmazeutische Analytik 89-90 (1992)

72. SCHELER W.
Grundlagen der allgemeinen Pharmakologie
Gustav Fischer Verlag Jena (1989)

73. SHUTTLEWORTH CW., BRENNAN AM., CONNOR JA.
NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices.
J Neuroscience 23, 3196-3208 (2003)

74. SCHMIDT R. F.
Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie
Springer (2007)

75. SCHMIDT W.
Optische Spektroskopie (1994)

76. SCOTT TG., SPENCER RD., LEONARD NJ., WEBER G.
Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH, and simplified synthetic models.
J Am Chem Soc 3, 687-695 (1970)

77. SLADE N., STORGA-TOMIC D., BIRKMAYER GD., PAVELIC K., PAVELIC J.
Effect of extracellular NADH on Human Tumor Cell Proliferation.
Anticancer Research, 19, 5355-5360 (1999)

78. STRADFORD M.R., DENNIS M.F., HOPKINS P.J., SAUNDERS M.I., HODGKISS R.J., ROJAS A.
Nicotinamide pharmacokinetics in normal volunteers and patients undergoing palliative radiotherapy
Acta Oncologica 35, 213-219 (1996)

79. STRYER, L.
Biochemistry (New York: W.H. Freeman and Company) (1988)

80. SWERDLOW RH
Is NADH effective in the treatment of Parkinson's disease?
Drugs Aging 13, 263-8 (1998)

81. STRONG AJ., HARLAND SP., MELDRUM BS., WHITTINGTON DJ.
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, 367-377 (1996)

82. VRECKO K., BIRKMAYER JGD., KRAINZ J.
Stimulation of dopamine biosynthesis in cultured PC 12 pheochromocytoma cells by the coenzyme nicotinamide adeninedinucleotide (NADH).
J Neural Transm 5, 147-156 (1993)

83. WAGNER G.
Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie 592-595 (1966)

-
84. WARBURG O., CHRISTIAN W.
Co-Fermentproblem
Biochem. Z. 274 112-116 (1934)
85. WESSLEY S., CHALDER T., HIRSCH S.
The prevalence and morbidity of chronic fatigue and chronic fatigue syndrome; a prospective primary care study.
Am J Public Health 87, 1449-1455 (1997)
86. XU M., ZHANG J.
The reduced coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) prevents hepatic cells from apoptosis by mitochondria-dependant signalling pathway.
International Journal of Modern Cancer Therapy Vol.3 No.1 (2000)
87. ZHANG JR., VRECKO K., NADLINGER K., STORGA TOMIC D., BIRKMAYER GD., REIBNEGGER
The Reduced Coenzyme Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) repairs DNA damage of PC12 Cells induced by Doxorubicin.
J Tumor Marker Oncol 13, 4, 5-17 (1998)
88. ZHANG JR., VRECKO K., NADLINGER K., STORGA D., BIRKMAYER GD., REIBNEGGER G.
The Reduced Coenzyme Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) rescues PC12 Cells from Apoptosis.
J Tumor Marker Oncol 13; 3, 11-19 (1998)
89. ZIEGENHORN J., SENN M., BÜCHER T.
Clin. Chem. 22, 151-160 (1976)

8. ABKÜRZUNGEN

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriophosphat
AU	arbitrary units
CFS	Chronic fatigue syndrome
Co I	Coenzym I
DPN	Diphosphopyridinnucleotid
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
L-DOPA	Levodopa, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat
TPN	Triphosphopyridinnucleoid

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Mike-Percy Hentschke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Prüfung der parenteralen und enteralen Bioverfügbarkeit von reduziertem Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH) im ZNS der narkotisierten Ratte mittels Laser-induzierter Fluoreszenzspektroskopie“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.