

## 2. Literatur

### 2.1. Biologische Funktion und chemisch-physikalische Eigenschaften von NADH

#### 2.1.1. NADH und seine Rolle im Zellmetabolismus als Elektronencarrier

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

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

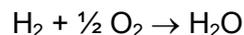
1. Die im Extrazellulärraum stattfindende, von Enzymen angetriebene „Verdauung“. Hier findet die Aufspaltung makromolekulärer Nahrungsbestandteile in ihre Untereinheiten statt: Kohlenhydrate werden zu Glukose, Proteine zu Aminosäuren und Fette zu Fettsäuren und Glycerol abgebaut.
2. Umwandlung der genannten Untereinheiten in Pyruvat und Azetyl-Coenzym A (Azetyl-CoA). Im Zytosol findet die Konversion der meisten aus Kohlenhydraten stammenden Kohlenstoff- und Wasserstoffatome zu Pyruvat statt, letzteres diffundiert durch die Mitochondrienmembran und wird dort zur Azetyl-Gruppe von Azetyl-CoA weiterverarbeitet. Fettsäuren werden direkt in Azetyl-CoA umgewandelt. Bei diesem Schritt entstehen bereits geringe Mengen ATP und NADH.
3. Vollständige Oxidation von Azetyl-CoA zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_2$  unter gleichzeitiger Bildung großer Mengen ATP, NADH und Wärme.

Die Glykolyse stellt den zentralen Prozess beim Abbau der Kohlenhydrate in Stufe zwei dar. Die aus dem vorhergehenden Schritt stammenden Glukose-Untereinheiten (6 C-Atome) werden zu zwei Molekülen Pyruvat (3 C-Atome) abgebaut, energetisch gesehen resultieren dabei 2 ATP und 1 NADH, durch die Umwandlung von  $\text{NAD}^+$  in NADH. Unter aeroben Bedingungen schließt sich die Weiterverarbeitung von Pyruvat im Citrat-Zyklus innerhalb der Mitochondrien an. Unter anaeroben Bedingungen findet stattdessen ein als Fermentation (Gärung) bezeichneter Prozess statt, bei dem Pyruvat abhängig vom Organismus z.B. zu Ethanol und  $\text{CO}_2$  (Hefen) bzw. abhängig vom Gewebetyp zu Laktat (Skelettmuskel)

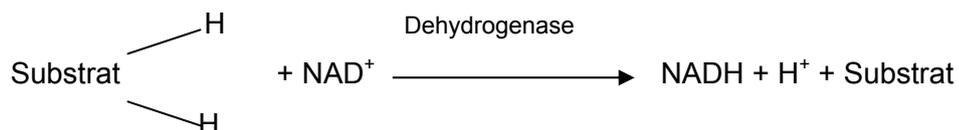
verarbeitet wird. Im anaeroben Medium ist die Glykolyse der zentrale ATP-Generator (Stryer, 1996).

Der dritte Abschnitt des Katabolismus ist nur unter aeroben Bedingungen möglich. Zu Beginn desselben steht der Krebs-Zyklus. Im Verlauf des zyklischen Abbaus der Acetyl-Gruppe von Acetyl-CoA über Zitronensäure bis zur Regeneration des Acetyl-Akzeptors Oxalacetat entstehen energiereiche Verbindungen in Form von 1 GTP (alle Triphosphat-Nukleoside sind auf Grund der Reaktion  $\text{GTP} + \text{ADP} = \text{GDP} + \text{ATP}$  als energetisch äquivalent anzusehen). Die verbleibende Energie wird in die Reduktion Wasserstoff transportierender Moleküle kanalisiert:  $3 \text{NAD}^+ \rightarrow 3 \text{NADH}$ ,  $1 \text{FAD} \rightarrow 1 \text{FADH}_2$ . Als Abfallprodukt resultieren außerdem 2 Moleküle  $\text{CO}_2$ .

An letzter Stelle des Katabolismus steht die oxidative Phosphorylierung: 30 der insgesamt 36 ATP Moleküle, die bei der Oxidation von Glukose zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  anfallen, werden in diesem Abschnitt gebildet. Vereinfacht gesagt entspricht die hier ablaufende Reaktion einer Übertragung von Wasserstoff auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasser:



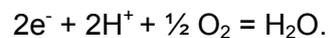
Trotz Komplexität ist die ATP Ausbeute der vorhergehenden Schritte (Glykolyse und Citrat-Zyklus) eher unbedeutend. Die Funktion von Glykolyse und Citrat-Zyklus besteht jedoch vielmehr darin, die in Glukose gespeicherten Wasserstoffatome in eine oxidationstaugliche Form zu bringen, damit diese im letzten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



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

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

Letztendlich reagieren die über die Elektronentransportkette gelaufenen Elektronen mit im externen Medium gelösten Protonen und Sauerstoff unter Bildung von Wasser:



Die Passage der von NADH abgegebenen Elektronen durch die Elektronentransportkette ist die notwendige Voraussetzung, um die in Elektronen gespeicherte elektrische Energie in die physiologisch nutzbare Energieform ATP umzusetzen.

Die Atmungskette besteht aus einer Reihe von Carriermolekülen, die je nach Autor in drei bzw. fünf multimerische Haupt-Enzymkomplexe (Komplex I-V) gegliedert wird. Diese Enzymkomplexe befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran. Ihre Aufgabe besteht darin, die von NADH abgegebenen Elektronen auf  $O_2$  zu übertragen (Stryer, 1988). Auf jeder Stufe des Transfers fallen die Elektronen in einen niedrigeren Energiezustand. Die dabei freiwerdende Energie wird dazu genutzt, Protonen aus der Mitochondrienmatrix durch die innere Mitochondrienmembran in den intermembranären Raum zu pumpen. Der so entstandene Anstieg der Protonen Konzentration ist die Grundlage für den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran (Ladungs- und pH Differenz) (Alberts et al., 2004).

Die Aufklärung des lange Zeit unverständlichen Zusammenhangs zwischen Atmungskette und ATP Synthese geht auf die Arbeiten von Mitchell und Mitarbeiter (1961) zurück. Anhand der „chemi-osmotischen Hypothese“ konnte nachgewiesen werden, dass der energetisch günstige Elektronentransport an die energiekonsumierende Protonenpumpe gekoppelt ist. Der Protonenrückfluss entlang des Gradienten liefert die nötige Aktivierungsenergie für das Enzym ATP Synthase (Komplex V), welches die Reaktion  $ADP + \text{anorganisches Phosphat} \rightarrow ATP$  katalysiert.

Die von den Enzymkomplexen transportierten Elektronen reagieren mit molekularem Sauerstoff zur Bildung von  $H_2O$ , damit ist die oxidative Phosphorylierung abgeschlossen.

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

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

### 2.1.2. Strukturanalyse von NADH

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

Coenzyme fungieren als Carriermoleküle, d.h. sie agieren als Akzeptor oder Donator jener Komponenten, die für die jeweilige Reaktion benötigt werden (Elektronen, Wasserstoffatome, Phosphorgruppen etc.) (Alberts et al., 1989)

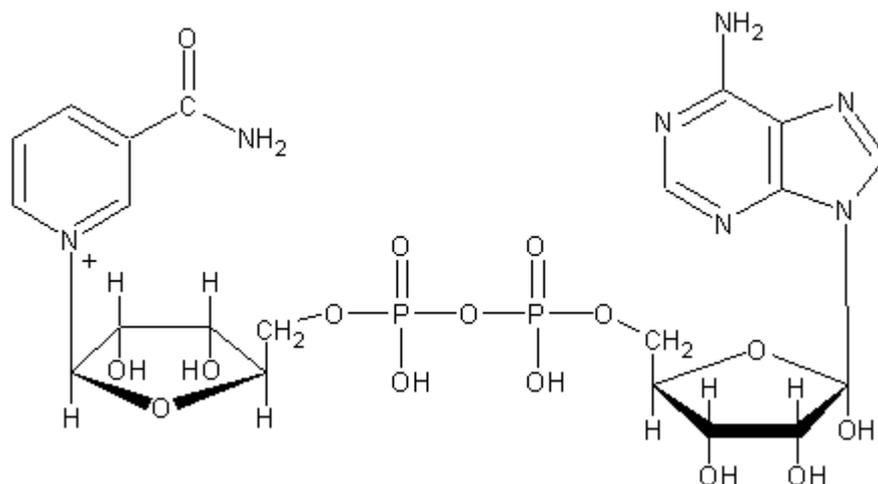
Hier einige Beispiele:

Wasserstoffübertragende Coenzyme:  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}^+$

Gruppenübertragende Coenzyme: ATP (Phosphatgruppe), CoA (Acetylgruppe).

Viele Coenzyme enthalten Vitamine als Bestandteil ihrer Struktur. Im Falle von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  stellt Vitamin  $\text{B}_3$  (Nicotinamid) diesen Grundbaustein dar. Ein Defizit dieses Vorläufers führt beim Menschen zum Krankheitsbild der Pellagra (Mahler und Cordes, 1966). 1915 wurde Pellagra von Goldberger als eine Mangelerkrankung erkannt, die durch entsprechende Ernährung (Leber, Fleisch, Hefe, Vollkornbrot) vermieden werden kann. 1937 isolierte Elvehjem aus Lebergewebe einen bei Pellagra wirksamen Faktor (PP-Faktor = Pellagra praeventium) und identifizierte diesen als Nicotinsäureamid.

Genaugenommen zählt Vitamin  $\text{B}_3$  gar nicht zur Gruppe der Vitamine, die per definitionem komplett von außen zugeführt werden müssen, da ca. 2/3 des Nicotinamidbedarfs aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert werden.



**Abb. 1:** Strukturformel von NADH

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

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

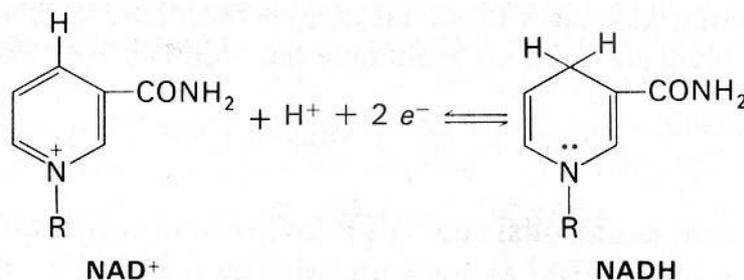
Ein wichtiges Struktur analogon von NADH ist dessen phosphorylierte Form Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH). NADPH ist im Unterschied zu NADH an der OH-Gruppe in 2' -Stellung der Ribose-Untereinheit mit Phosphorsäure verestert (Stryer, 1996). Die zusätzliche  $\text{PO}_3$  Gruppe befindet sich räumlich weit entfernt vom reaktiven Teil des Moleküls (Nicotinamidring) und hat deshalb weder einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften noch auf die Funktion als Elektronenüberträger. Sie dient jedoch als Verbindungsglied an jene Enzyme, für die NADPH als Coenzym notwendig sind. Durch den Vorgang der Phosphorylierung ist deshalb die selektive Wirkung beider Coenzyme garantiert. Generell gesehen katalysieren  $\text{NAD}^+$ -gebundene Dehydrogenasen Redoxreaktionen des oxidativen Stoffwechsels (Katabolismus), während  $\text{NADP}^+$ -gebundene Dehydrogenasen hauptsächlich an Stoffwechselprozessen reduktiven Charakters (Biosynthese) beteiligt sind (Stryer, 1988).

### **2.1.3. Spektroskopische Eigenschaften von $\text{NAD}^+$ /NADH**

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

NADH ist ein natürlich vorkommendes Fluorophor. Die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 360\text{nm}$  löst ein blaues Fluoreszenzsignal mit einem Maximum bei  $\lambda =$

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



**Abb.2:** Hydrierung des Nicotinamidringes

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

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

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

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

**Tabelle 1:** physiologisch vorkommende Fluorophore und deren charakteristisch spektroskopische Merkmale

Man kann deshalb davon ausgehen, dass ein im Kortex gemessenes Fluoreszenzsignal von 460nm nach Bestrahlung mit Anregungslicht der Wellenlänge 340nm wahrscheinlich grösstenteils von NADH ausgeht (Renault et al., 1982).

Es kann keine gesicherte Aussage darüber gemacht werden, ob das registrierte Fluoreszenzsignal von Gliazellen oder von Neuronen stammt. Aufgrund der charakteristischen Unterschiede im Stoffwechsel beider Zelltypen -Gliazellen zeigen einen vorwiegend glykolytisch, Neuronen einen ausgeprägt oxidativen Metabolismus- besteht jedoch die Annahme, dass die im Kortex registrierten Fluoreszenzsignale hauptsächlich aus neuronalen Zellen stammen (Ames, 2000).

Das Gehirn macht etwa 2,5% der Körpermasse aus und beansprucht 20% des Gesamtsauerstoffbedarfes. Der Grossteil der vom Hirn benötigten Energie wird zur neuronalen Signalübertragung verwendet. Studien mit radioaktiv markierter Glukose ergaben, dass etwa 60-75% der Gesamtenergie auf Glutamat-vermittelte exzitatorische Neurotransmission entfällt, wohingegen nur 10-15% auf GABA-vermittelte Reizleitung und 10-15% für den Stoffwechsel von Gliazellen benötigt werden (Shulmann et al. ,2004).

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass zur Energiegewinnung im Gehirn ausschließlich Glukose verwendet wird. Unter Bestimmung der NADH Fluoreszenz -als Ausdruck des oxidativen Stoffwechsels- wurde festgestellt, dass Laktat, v.a. in Astrozyten, möglicherweise auch als Energiequelle genutzt werden kann (Pellerin et al., 2004).

#### 2.1.4. Vorkommen von NADH

Im Intrazellulärraum kommt NADH sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien vor. Im Vollblut befindet sich NADH ausschließlich innerhalb der zellulären Komponenten (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) (Klingenberg, 1974). Im Extrazellulärraum (Zerebrospinalflüssigkeit) konnte kein NADH-typisches Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Mottin et al., 1997).

Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass im Intrazellulärraum die mitochondriale NADH Fraktion quantitativ überwiegt. Jöpsis und Mitarbeiter (1970) führten vergleichende Untersuchungen der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Katze und an isolierten Mitochondrien durch. Die Ergebnisse wurden durch NADH Konzentrationsmessungen aus Kortexproben ergänzt. Die NADH Fluoreszenz- und Konzentrationsmessungen wurden unter anoxischen und normoxischen Bedingungen, sowie unter paroxysmalen Krampfanfällen durchgeführt. Fluoreszenzzunahmen konnten bei allen Versuchen mit einer erhöhten intramitochondrialen NADH Konzentration korreliert werden, Fluoreszenzabnahmen hingegen mit einer erhöhten intramitochondrialen  $\text{NAD}^+$  Konzentration.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch verschiedene Untersuchungen des Zellstoffwechsels: Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung (Natriumzyanid, Amytal und Chloramphenicol) verursachten eine Zunahme der NADH Fluoreszenz, während 2,4 Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, eine Abnahme der NADH Fluoreszenz auslöste (Riepe et al., 1996; Rex et al., 1999; Mottin et al., 2003).

Man geht deshalb davon aus, dass die durch spektroskopische Methoden gemessenen NADH Fluoreszenzsignale in erster Linie dem Intrazellulärraum entstammen, bzw. hauptsächlich die intramitochondriale Konzentration von NADH widerspiegeln.

Auf Lakowicz und Mitarbeiter (1992) geht die Beobachtung zurück, dass die Fluoreszenzstrahlung von NADH zudem durch Bindung des Coenzyms an Proteine gesteigert werden kann. Diese Tatsache erklärt auch, warum intramitochondriales NADH, das fast ausschließlich in proteingebundener Form vorliegt, ein doppelt so starkes Fluoreszenzsignal als das vorwiegend ungebundene zytoplasmatische NADH emittiert. Letzteres bewegt sich frei im Zytosol und verliert durch Kollision mit Nachbarmolekülen (v.a.  $\text{O}_2$ ) einen Teil seiner Energie als Wärme und nicht als Fluoreszenzstrahlung. Da größtenteils an Proteine gebunden, ist das mitochondriale NADH relativ unbeweglich, die Kollision mit anderen Molekülen ist deshalb unwahrscheinlicher.

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

## **2.2. Mögliche therapeutische und diagnostische Einsatzgebiete von NADH**

Die Signalübertragung im zentralen Nervensystem ist eng an die Leistung des Energiestoffwechsels, d.h. an die mitochondriale Aktivität gekoppelt (Ames, 2000).

Auf Grund der Verflechtung zwischen Energiestoffwechsel und NADH sind in Folge metabolischer Störungen auch Veränderungen der NADH Konzentration, sowie Beeinträchtigung der neuronalen Funktionen zu erwarten. Da diese Art Störungen grundsätzlich jedes Organ befallen können, und der Energiemetabolismus grundlegender Ausdruck jeder Form von zellulärer Vitalität ist, ist auch verständlich, warum die Forschungsansätze, die sich mit der therapeutischen und diagnostischen Anwendung von NADH auseinandersetzen, ein derart breites Gebiet (Mitochondriopathien, Einsatz als Antidepressivum und Antihypertensivum, Tumordiagnostik etc.) umfassen.

### **2.2.1. Mitochondriale Erkrankungen**

Auf Grund der zentralen Rolle, die die Mitochondrien im Zellstoffwechsel spielen, kann eine Störung der Mitochondrienfunktion von schweren pathologischen Folgen begleitet sein. In den 60er Jahren wurden erste Forschungen auf diesem Gebiet begonnen (Luft, 1962), seitdem wurden etwa 120 Mitochondriopathien identifiziert. Mitochondriopathien sind klinisch, biochemisch und genetisch heterogene Erkrankungen, die auf Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels beruhen (Definition: Deutsche Gesellschaft für Neurologie und Mitochondriale Erkrankungen). Betroffen sind vor allem Organsysteme mit einem hohen Energie- und Sauerstoffbedarf (Gehirn, Skelettmuskel) (Löbert, 2003).

Die zugrunde liegenden erblichen oder erworbenen mitochondrialen DNA (mt DNA) Mutationen bewirken ein Funktionsdefizit des lokalen Energiestoffwechsels, v.a. der oxidativen Phosphorylierung und des Fettsäureabbaus. Aufgrund der unterschiedlichen genetischen Defekte, die eine Mitochondriopathie bedingen können, ist die klinische Manifestation sehr vielfältig, weshalb sich Klassifizierung und Diagnostik mangels charakteristischer Symptome schwer gestalten. Eine eindeutige Diagnose ist oft nur durch *post mortale* Untersuchungen möglich.

Mitochondriale Funktionsstörungen haben sich in den vergangenen Jahren, neben anderen Ursachen, als kausale Faktoren in der Pathogenese neurodegenerativer und neurometabolischer Erkrankungen beim Menschen herausgestellt (Byrne, 2002). Die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen, denen eine Mitochondrienbeteiligung

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

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

### **2.2.2. Physiologischer Alterungsprozess**

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

Proteine, Fette und DNA wiederum eine gesteigerte Radikalproduktion nach sich zieht (Enns, 2003). Barrientos und Mitarbeiter (1999) konnten nachweisen, dass eine direkte quantitative Korrelation zwischen freier Radikalproduktion und Apoptoserate besteht.

Zarchin und Mitarbeiter (2002) untersuchten an Ratten, wie sich der Alterungsprozess auf den Energiestoffwechsel auswirkt. Jüngere Tiere reagierten auf Anoxie mit einer Zunahme der NADH Konzentration um  $36\pm 2\%$ , wohingegen bei alten Tiere nur eine NADH Konzentrationszunahme um  $9\pm 4\%$  zu registrieren war. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, dass im gealterten Hirn strukturelle und funktionelle Veränderungen stattgefunden haben, die eine adequate Reaktion der Mitochondrien auf anoxische Bedingungen nicht möglich machen.

Mitochondrien werden als „Schrittmacher“ des Alterungsprozesses angesehen, da in ihnen die Hauptproduktion freier Radikale stattfindet, was wiederum eine Störung der oxidativen Phosphorylierung, des Elektronen Transportes, sowie verschiedener mitochondrialer Enzyme nach sich zieht (Sohal, 1993).

Es existiert eine direkte Beziehung zwischen Alterungsprozess, reduzierter neurologischer Aktivität und zerebralem oxidativem Stress.

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

### **2.2.3. Morbus Parkinson**

Die Mehrheit der Parkinsonerkrankungen tritt spontan auf, nur einige wenige sind auf erbliche Faktoren oder Einwirkung von Umweltgiften wie z.B. Kohlenmonoxid, Mangan und MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) (Orth et al., 2002) zurückzuführen. Morbus Parkinson (MP) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters. Histologisch steht ein Untergang dopaminergener Neurone, vor allem in der Substantia nigra, im Vordergrund. Symptomatisch äußert sich dieser Verlust in Form einer pathognomonen Trias von Akinese, Rigor und Ruhetremor.

Aus biochemischer Sicht liegt in erster Linie eine Funktionsstörung des Komplex I der Elektronentransportkette, der Neuronen der Substantia nigra vor, allerdings ist noch nicht geklärt, ob auch andere Strukturen (Skelettmuskel und Thrombozyten) und Enzymkomplexe

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

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

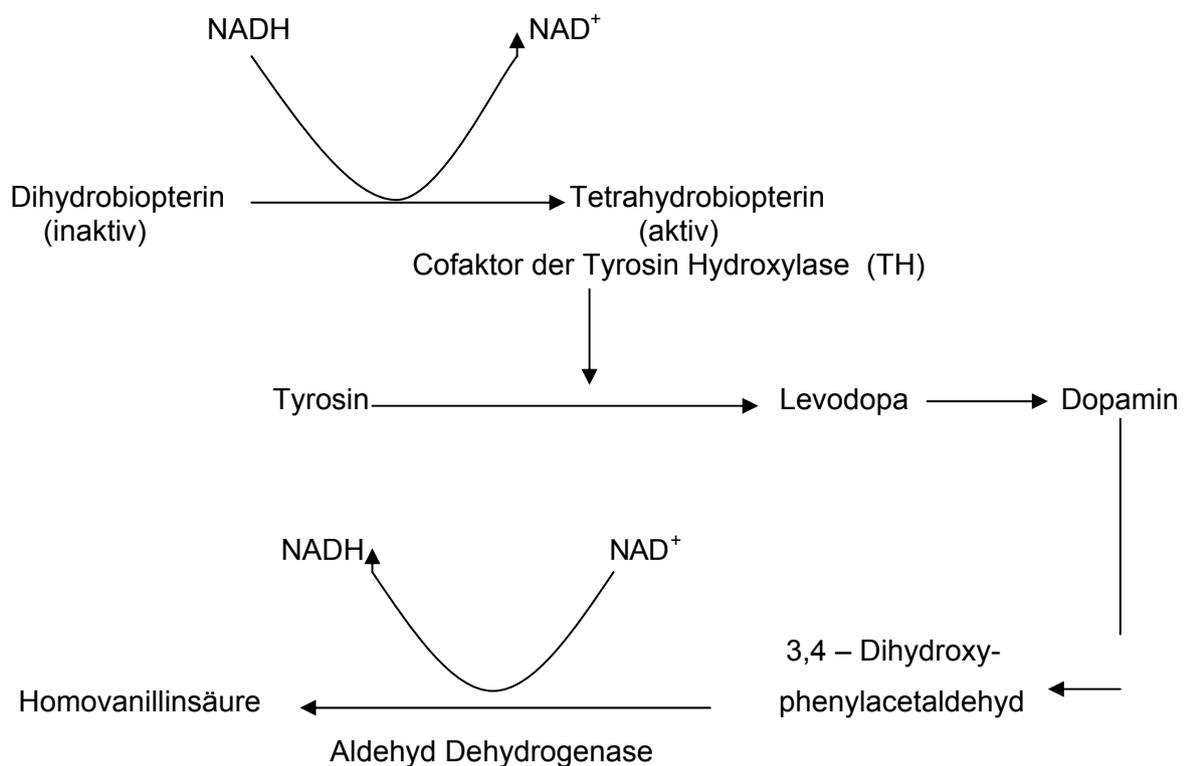
- Eine Zunahme der Eisenkonzentration in der Substantia nigra,
- Eine Abnahme der Glutathion-Konzentration in der Substantia nigra.

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

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

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

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



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

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

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

vermarktet und zur Bekämpfung von Parkinson, Alzheimer sowie Müdigkeit (jet lack) empfohlen ([www.enada.com](http://www.enada.com)).

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

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

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

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

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

Birkmayer verweist mehrfach auf eine in Planung befindliche doppel-blind Studie, in der die Ergebnisse der offenen Studien überprüft werden sollen. Auch nach intensiver Literaturrecherche konnte ich jedoch keinen Hinweis auf Publikation einer solchen finden.

Die einzige doppel-blind Studie, die zur Untersuchung der Wirkung von NADH bei Parkinson Patienten durchgeführt wurde, stammt von Dizdar und Mitarbeitern (1994). Die Studie umfasste zwar nur 10 Patienten, und obwohl praktisch die gleichen Versuchsbedingungen wie in der Birkmayer Studie gewählt wurden (NADH 25mg/Tag intravenös 4 Tage lang, anschließend NADH 25mg intramuskulär am 20. und am 35. Tag im Vergleich zu Kontrollen, bei denen nach dem gleichen Schema isotone Kochsalzlösung verabreicht wurde sowie Beibehaltung der vorherigen Parkinson Therapie), konnten die Ergebnisse von Birkmayer nicht reproduziert werden. Eine Tendenz zur symptomatischen Verbesserung konnte sowohl in der NADH als auch in der Plazebo Gruppe beobachtet werden, die Veränderungen waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Ebenso konnte die von Birkmayer (1989) postulierte Beobachtung, dass NADH (25mg/Tag täglich 11-15 Tage lang, bzw. jeden zweiten Tag IV verabreicht) die Homovanillinsäure (HVS) Konzentration im Urin steigert nicht bestätigt werden. Dizdar und Mitarbeiter (1994) analysierten die Konzentration von HVS in Liquor cerebrospinalis von 5 Parkinsonpatienten nach NADH Gabe (25mg/Tag 4 Tage lang intravenös verabreicht + NADH 25mg intramuskulär am Tag 20 und 35). Es konnte keine Veränderung der HVA Konzentration registriert werden.

Swerdlow (1998) warnt vor einer übereilig unfundierten positiven Interpretation der Wirkung von NADH bei Parkinson Patienten. Er weist daraufhin, dass in der Pathogenese von Morbus Parkinson vorrangig Komplex I der Elektronen Transportkette (NADH: Ubichinon Oxidoreduktase) funktionell eingeschränkt ist, nicht jedoch die Enzyme der Katecholaminsynthese (Orth und Schapira, 2001). Komplex I erhält Elektronen von NADH und überträgt diese auf Ubichinon. Während dieses Vorganges wird NADH oxidiert und steht erneut als Elektronenakzeptor  $\text{NAD}^+$  zur Verfügung. Daraus folgt, dass eine Dysfunktion der NADH Ubichinon Oxidoreduktase automatisch zu einer Ansammlung von NADH führt, was wiederum bedeutet, dass bei Vorliegen eines Morbus Parkinson bereits ein Überschuss an NADH besteht. Vor diesem Hintergrund erscheint eine zusätzliche Gabe von NADH deshalb eher fraglich.

Swerdlow streitet die Wirkung von NADH nicht ab, er weist jedoch darauf hin, dass die von Birkmayer aufgestellte Theorie bezüglich des Wirkmechanismus von NADH kritischer Überarbeitung bedarf. Denkbar wäre beispielsweise auch, dass NADH die Dopaminkonzentration durch Beeinflussung des Abbauenzym Aledhyd-Dehydrogenase (siehe Abb. 3) verbessert.

## 2.2.4. Morbus Alzheimer

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

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

COX-Aktivität im frontalen Kortex: - 26%

COX-Aktivität im temporalen Kortex: -17%

COX-Aktivität im parietalen Kortex: - 16%.

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

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

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

Plaques erhöht, was dafür spricht, dass die Bildung der senilen Plaques, zumindest phasenweise, von einer erhöhten Enzymaktivität begleitet ist.

Zubenko und Mitarbeiter (1990) wiesen pathologische Veränderungen der Cytochrom C Reduktase (Komplex IV) des endoplasmatischen Retikulums sowohl im Gehirn als auch in Thrombozyten von Alzheimer Patienten nach. NADH ist als Cofaktor der Cytochrom C Reduktase für dessen Funktionalität unerlässlich.

Das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte, von NADH als Cofaktor abhängige, Peptid bindende Protein  $\beta$ -Amyloid (ERAB) ist schon seit längerer Zeit dafür bekannt, dass es einige der neurotoxischen Effekte der für Alzheimer typischen amyloiden Plaques vermittelt (Yan et al., 1997). He und Mitarbeiter (1998) isolierten aus menschlichem Hirngewebe ein als L-3-hydroxyacyl-Coenzym A Dehydrogenase bezeichnetes Enzym, das in seiner Aminosäuresequenz identisch mit ERAB ist.

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

### 2.2.5. Wirkung von NADH auf die Apoptoserate

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, existiert eine direkte Beziehung zwischen physiologischem Alterungsprozess und Apoptoserate. Der programmierte Zelltod stellt einen Schutzmechanismus dar, um gezielt Zellen zu entfernen, die nicht mehr gebraucht werden, bzw. die für den Organismus potentiell schädlich sind.

Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch eine hohe Apoptoserate aus (Mukherjee et al., 1997). In neoplastische Veränderungen hingegen, die durch unkontrolliertes Wachstum auffallen, ist eine komplette oder teilweise lokale Aufhebung der Apoptose zu beobachten.

In verschiedenen Studien wurde untersucht, ob NADH sowie  $\text{NAD}^+$  und Nicotinamid die Apoptose aufhalten bzw. in irgendeiner Weise beeinflussen können.

Von der Überlegung ausgehend, dass in der Pathogenese neurodegenerativer Krankheiten oxidativer Stress und Apoptose eine wichtige Rolle spielen, führten Klaidmann und Mitarbeiter (1996) Versuche an Mäusen durch, bei denen die protektive Wirkung von  $\text{NAD}^+$  gegenüber Apoptose auslösender Stimuli (Tertiäres-Butylhydroperoxid: t-buOOH) untersucht werden sollte; t-buOOH wurde intrazerebroventriculär verabreicht, woraufhin charakteristische apoptotische Veränderungen (u.a. DNS Fragmentierung) beobachtet werden konnten. Fand hingegen eine Vorbehandlung mit Nicotinamid (500mg/kg, intraperitoneal) 13 Stunden vor Injektion des Toxins statt, so konnte die DNS Fragmentierung komplett unterbunden werden. Im Zuge der Apoptose kommt es zur Depletion der  $\text{NAD}^+$  und ATP Reserven. Schädigung der DNS löst eine Aktivierung des Enzyms poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) aus, welches  $\text{NAD}^+$  als Substrat verwendet. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen hoher  $\text{NAD}^+$  Konzentrationen, gesteigerter PARP Aktivität und DNS Reparaturrate (Sato et al., 1993).

Bestätigt wurden diese Beobachtungen u.a. durch Untersuchungen an Astrozytenkulturen (Ying et al., 2004). Die Aktivierung von PARP führte zu einer schnellen teilweisen Depletion von  $\text{NAD}^+$ , was mit einer kompletten Hemmung der Glykolyse einherging. Kurze Zeit später starben die Zellen. Eine Zugabe von  $\text{NAD}^+$  führte zur Wiederaufnahme der Glykolyse und zur Verhinderung der Apoptose. Die Autoren folgern aus diesen Ergebnissen, dass aktiviertes PARP zu einer schnellen Depletion des zytoplasmatischen  $\text{NAD}^+$  Pools, nicht jedoch der mitochondrialen  $\text{NAD}^+$  Reserven führt. Im ersten Fall ist die Zelle nicht mehr in der Lage Glukose aufzunehmen und daraus Energie zugewinnen. Da das Gehirn fast ausschliesslich Glukose als Energiequelle verwendet, ist es für diese Art Störungen ganz besonders anfällig. Die neuroprotektive Wirkung von Nicotinamid wurde auch im Rahmen von Verhaltensversuchen getestet (Yang et al., 2004). 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) löst bei Mäusen einen Verlust dopaminerger Neurone aus, was

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

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

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

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

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

Die Ursache dieser selektiv antiproliferativen Wirkung wird damit erklärt, dass Tumorzellen freie Radikale (v.a.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) produzieren, die wiederum das Wachstum des Tumors fördern (Burton, 1995). NADH zeichnet sich durch eine potente anti-oxidative Wirkung aus, es kann freie Radikale neutralisieren und so deren wachstumsfördernde Wirkung auf das neoplastische Gewebe schmälern.

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

## 2.2.6. Mögliche antidepressive Wirkung von NADH

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **2.2.7. Antihypertensiver Effekt von NADH**

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

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

### **2.2.8. Experimenteller Einsatz der NADH Fluoreszenzmessung zur Bestimmung der TumorgroÙe**

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

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

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

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

### **2.2.9. Experimenteller Einsatz der NADH Fluoreszenzmessung zur Erkennung ischämischer Läsionen**

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

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

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

Die Entstehung einer zerebralen ischämischen Läsion ist vom Auftreten sogenannter vorübergehender fokaler Depolarisationen (transient focal depolarisations: TFDs) begleitet.

Untersucht wurde dieses Phänomen u. a. von Strong und Mitarbeitern (1996), die eine Methode entwickelten, um TFDs in Zusammenhang mit anderen physiologischen Parametern studieren zu können. Einer dieser Parameter ist das Redoxpaar  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ , welches als Markermolekül für TDFs genutzt werden kann. TDFs erzeugen entweder einen vermehrten Übergang von  $\text{NAD}^+$  nach  $\text{NADH}$  und/oder eine Abnahme des lokalen Blutflusses. Beide Veränderungen resultieren in einer Zunahme der lokalen Fluoreszenz.

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

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

Einige ischämische Insulte sind vorübergehender Natur, da sich nach einiger Zeit der normale Blutfluss erneut einstellt. Dieses als Reperfusion bezeichnete Phänomen kann ebenfalls zu unphysiologischen Stoffwechselreaktionen führen und pathologische Folgen nach sich ziehen. Martin und Mitarbeiter (2004) untersuchten diese Folgen am Beispiel des Enzyms Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHC). PDHC katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und  $\text{CO}_2$ , gleichzeitig entsteht durch die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  ein Molekül  $\text{NADH}$ . Ischämie und Reperfusion beeinträchtigen die Funktionalität der PDHC,

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

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

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

## 2.3. Nachweismethoden für NADH

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

Zur Konzentrationsbestimmung von Pyridinnukleotiden stehen verschiedene Methoden zur Verfügung:

- Enzymatische Verfahren:
- HPLC
- Laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie

Die enzymatischen Verfahren nutzen die Funktion der Pyridinnukleotide ( $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$ ) als Coenzym aus (Passonneau und Lowry, 1974). Die Bestimmung von NADH wird durch die Reaktions-Koppelung mit einem NADH-abhängigen Enzym erleichtert. Durch Zusatz eines entsprechenden Substrates wird das Enzym aktiviert. Da der Reaktionsablauf von einer Umwandlung des NADH in  $\text{NAD}^+$  oder umgekehrt begleitet ist, kann durch eine nachfolgende spektroskopische Analyse der  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  Gehalt bestimmt werden (Rapoport, 1975).

Innerhalb der enzymatischen Verfahren unterscheidet man zwischen spektrophotometrischer und fluorimetrischer Bestimmung sowie dem Enzymatic Cycling.

Für die Klärung einiger Fragestellungen ist die Gesamtbestimmung von NADH/ $\text{NAD}^+$  ausreichend. In anderen Fällen ist es sinnvoll,  $\text{NAD(P)H}$  vor der Extraktion erst vollständig in  $\text{NAD(P)}$  zu oxydieren. Bei den älteren Bestimmungsmethoden muss der Pyridinnukleotid-Bestimmung erst eine Extraktion aus zellulären und subzellulären Strukturen vorausgehen.

Erschwert wird die Extraktion dadurch, dass die reduzierten Pyridinnukleotide NADH und NADPH im sauren Milieu instabil sind. Falls nötig muß eine Trennung deshalb unter Zusatz von Alkali durchgeführt werden, wobei die oxydierten Formen zerfallen (Klingenberg, 1974).

## **2.3.1. Enzymatische Verfahren zum Nachweis von NADH**

### **2.3.1.1. Spektrophotometrische Bestimmung**

Mit Hilfe der spektrophotometrischen Absorption kann man den Gehalt an Pyridinnukleotiden mit hoher Genauigkeit bestimmen, vorausgesetzt, die vorhandene Menge unterschreitet einen Wert von 10nM nicht (Klingenberg, 1974).

Prinzipiell können alle NADH-abhängigen Dehydrogenase Reaktionen in diesem Verfahren genutzt werden; besonders häufig verwendet man jedoch die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase. Die NADH Bestimmung erfolgt im einem alkalischen, nach Neutralisation gepufferten Extrakt. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert die Oxidation von NADH durch Dihydroxyacetonphosphat. Nach Reaktionsablauf erfolgt die spektroskopische Bestimmung von NADH bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340\text{nm}$  gegen eine Vergleichsküvette mit verdünnter Kaliumdichromat-Lösung. Rechnerisch erhält man die NADH-Menge pro Volumeneinheit des Untersuchungsmaterials (Klingenberg, 1974).

### **2.3.1.2. Fluorimetrische Bestimmung**

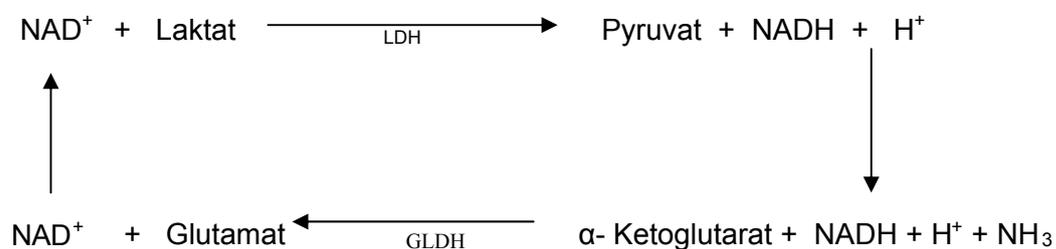
Die fluorimetrische Methode zeichnet sich durch eine höhere Empfindlichkeit als das vorhergehende Verfahren aus und ist deshalb zur Bestimmung kleinerer Mengen von NADH (bis zu 0,05 nMol) geeignet (Klingenberg, 1974).

Die reduzierten Pyridinnukleotide NADH und NADPH besitzen die Eigenschaft der Autofluoreszenz, d.h. bei Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge emittieren sie ein Fluoreszenzsignal. Im analytischen Versuchsaufbau verwendet man dazu eine Quecksilber- oder Xenonlampe, die das Anregungslicht produziert. Dieses wird vor Erreichen des Probenextraktes durch einen optischen Filter (Monochromator) geschickt, der nur Anregungslicht der Wellenlänge  $\lambda = 340\text{nm}$  passieren lässt. Das Zusammentreffen von Anregungslicht und Probengemisch löst ein Fluoreszenzsignal aus, das vor Registrierung ebenfalls durch einen Monochromator geschickt wird, der ausschließlich für  $\lambda = 450\text{nm}$  durchlässig ist. Am Detektor angekommen, wird die Intensität der eintreffenden Strahlung bestimmt.

Der Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass das emittierte Fluoreszenzsignal nur in willkürlichen Einheiten abgelesen werden kann. Durch den Zusatz einer NAD-Lösung zum Extrakt muss dieser stets geeicht werden (Klingenberg, 1974).

### 2.3.1.3. Enzymatic cycling

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



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



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

### **2.3.2. Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Der Einsatz der HPLC zur Bestimmung von Pyridinnukleotiden ist relativ jungen Datums. Mit der von Klaidman und Mitarbeiter 1995 erarbeiteten Methode ist es möglich, die Gesamt-Pyridinnukleotid Menge (zytoplasmatische, nukleäre und mitochondriale Fraktion) zu bestimmen. Es handelt sich um ein hochsensitives Verfahren, bei dem oxidierte und reduzierte Formen gleichzeitig bestimmt werden. Die oxidierten Formen werden in basischem Milieu durch Verbindung mit Zyaniden in fluoreszierende Produkte umgewandelt. In der anschließenden chromatographischen Analyse zeigen letztere andere Retentionszeiten als die reduzierten Pyridinnukleotide.

Kritischer Punkt aller bisher genannter Bestimmungsmethoden ist die Gefahr, dass es zu einer künstlichen Umwandlung oxidiertes in reduzierte Formen kommen kann.

Der Vorteil des HPLC Verfahrens besteht darin, dass aufgrund der geringen Anzahl von Zwischenschritten eine schnelle Verarbeitung stattfinden kann, wodurch es kaum zu einer Umwandlung bzw. Abbau einzelner Komponenten kommt. Als Probenmaterial genügen bereits 10mg Gewebe. Auch das HPLC Verfahren kann nicht zur in vivo Bestimmung von NADH verwendet werden. Es liefert, wie das enzymatic cycling, nur einmalige Aussagen über die momentane Konzentration von NADH in einer Probe.

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

Bei der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich um eine qualitative bzw. auch semi-quantitative Methode zum Nachweis autofluoreszierender Substanzen.

Die Fluoreszenz, die ein Molekül emittiert, ist durch folgende Parameter charakterisiert:

Intensität, Fluoreszenzspektrum, Fluoreszenzlebensdauer sowie zeitliches Abklingverhalten. Während die Intensität der Fluoreszenzstrahlung von der Konzentration der zu messenden Substanz abhängig ist, handelt es sich bei den anderen Parametern um individuelle Merkmale, die es erlauben, ein fluoreszierendes Molekül eindeutig zu identifizieren. Das Fluoreszenzspektrum von NADH zeigt ein Maximum bei  $\lambda = 460\text{nm}$ . NADH hat eine kurzlebige Fluoreszenz von 0,4ns.

Trägt man die Fluoreszenzstrahlung (Intensität) einer wässrigen NADH Lösung in Abhängigkeit der Zeit auf, so erhält man eine charakteristische Kurve, die das Abklingverhalten der Fluoreszenzstrahlung von NADH widerspiegelt.

Vorausgesetzt, man kennt die charakteristischen Daten des zu untersuchenden Moleküls, so ist es durch den Einsatz zeitlicher und spektraler Filter möglich, selektiv Fluoreszenzsignale einer bestimmten Wellenlänge zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Aussenden des Anregungslichtes zu messen (Pfeifer et al., 1996).

Rex und Mitarbeiter (2001) führten anfangs Versuche mit breiten zeitlichen Toren durch. Unter diesen Bedingungen konnte die NADH Fluoreszenz, aufgrund hoher Hintergrundfluoreszenz durch Fremdfluorophore, jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Die Autoren ziehen deshalb für alle weiteren Versuche den Schluss, nur noch kurze Zeittore (2ns) zu verwenden.

### **2.3.3.1. Aufbau eines Laserfluoroskopes**

Ein Laserfluoroskop besteht aus den folgenden Grundbausteinen (siehe auch Abb.6, S.50)

Als Lichtquelle fungiert ein gepulster Stickstofflaser, der kurze Lichtimpulse einer gewünschten Anregungswellenlänge aussendet. Bevor es zur Emission von Fluoreszenzlicht kommt, ist der Laserstrahl bereits abgeklungen. Dadurch existiert ein kurzes zeitliches Fenster, in dem die NADH Fluoreszenz ohne Störung durch Streustrahlung des Anregungslichtes gemessen werden kann (Fink et al., 1993).

Die Lichtimpulse werden über eine optische Glasfasersonde zum Probengewebe (Kortex) geleitet. Ein Teil der Lichtstrahlen verlässt die Sonde in senkrechter Richtung, trifft auf das Gewebe, dringt bis zu 0,5mm ein und regt auf dieser Strecke die vorhandenen NADH Moleküle zur Fluoreszenz an. Ein anderer Teil der Strahlen verlässt die Sonde schräg und trifft deshalb in einem schrägen Winkel auf das Gewebe. Diese Strahlen dringen nicht in die Probe ein, sondern werden als Streulicht reflektiert. In unserem Versuchsaufbau werden sowohl Fluoreszenz- als auch Streulicht registriert. Eine andere Lichtleitfaser, fängt die rückläufigen Strahlen ein und leitet diese in Richtung Empfängereinheit weiter. Durch Passage einer Y-förmigen Kreuzung werden Fluoreszenz- und Streulicht getrennt und anschließend separat über optische Filter geleitet. Diese dienen dazu, Fluoreszenzstrahlen bestimmter Wellenlänge zu selektieren, alle andersartigen Signale werden ausgefiltert. Die technische Einheit der optischen Filter bezeichnet man auch als Monochromator.

Nachgeschaltet befindet sich ein Photomultiplier, dessen Funktion darin besteht, das gefilterte Signal zu verstärken.

Eine weitere „Signalreinigung“ findet durch den Einsatz eines Zeittores statt. Wie bereits erwähnt, besteht dessen Aufgabe darin, durch Öffnen und Schließen der Signalleitung zu bestimmten Zeitpunkten und in einem bestimmten Rhythmus nur Signale mit gewünschten Eigenschaften passieren zu lassen. Die Einstellung des Zeittores kann an die

Aufgabenstellung angepasst werden, d.h. in unserem Fall an die Fluoreszenzlebensdauer von NADH.

Das doppelt gefilterte Signal erreicht nun die Empfängereinheit, welche die elektrischen Impulse in graphische Daten umwandelt, die auf einem Bildschirm dargestellt werden.

### **Vorteile dieser Methode**

Die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie bietet einerseits die Möglichkeiten, die bereits ältere fluorometrische Methoden leisteten, wie Messungen *in vivo* und selektiv optische Signaldetektion durch den Einsatz zeitlicher Filter. Zusätzlich verfügt sie allerdings über mehrere entscheidende Vorteile:

Die Verwendung eines Lasers als Generator von Anregungslicht hat im Vergleich zu anderen Lichtquellen den Vorteil, dass er monochromatisches Licht produziert.

Die Wellenlänge des Anregungslichtes kann so der Aufgabenstellung angepasst werden, wodurch die selektive Anregung einer bestimmten Molekülsorte ermöglicht wird. Von NADH ist bekannt, dass es Anregungslicht der Wellenlänge 340nm absorbiert (Lakowicz, 1999), entsprechend wurde in unserem Versuchsaufbau eine Anregungswellenlänge von 337nm gewählt.

Die üblichen Methoden der Fluoreszenzdetektion sind statische Verfahren, d.h. sie liefern Information über Intensität und spektrale Verteilung des emittierten Lichtes, meistens in Form eines statischen Fluoreszenzspektrums. Über charakteristische Eigenschaften, wie z.B. das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz, können in der Regel keine Aussagen getroffen werden.

Nicht so im Falle der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie. Durch den Einsatz zeitlicher Filter wird eine selektiv zeitliche Signaldetektion ermöglicht, wodurch charakteristische Eigenschaften wie Fluoreszenzlebensdauer und zeitliches Abklingverhalten als zusätzliche Identifikationsdaten zur Verfügung stehen.

Zum Transport von Anregungs- und Emissionslicht wurden sehr feine faseroptische Sonden verwendet (Durchmesser von Kabel und Sondenspitze 100 $\mu$ m). Anregungslicht kurzer Wellenlänge (337nm) dringt bis zu 0,5mm in das Gewebe (Chance et al., 1962). Das eigentliche Probenvolumen beträgt 0,04 $\mu$ l (Rex et al., 2001), wodurch eine hohe räumliche Auflösung erzielt wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich im Rahmen der NADH Fluoreszenzbestimmung die LIF als eine adequate Nachweismethode bewährt hat, die sich sowohl durch eine hohe Spezifität als auch durch hohe zeitliche und räumliche Auflösung

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

### **Nachteil der Methode**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mayevsky und Mitarbeiter (1999 und 2004) entwickelten ein Gewebefluoroskop, das neben anderen Parametern, die NADH Fluoreszenz als Ausdruck histologischer Vitalität misst. Diese Technik fand im experimentellen Rahmen bereits Einsatz bei der Überwachung von Intensivpatienten und zur Kontrolle der Gewebevitalität während neurochirurgischer Eingriffe. Versuche mit Neurotoxinen zeigten, dass die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie Stoffwechselveränderungen *in vitro* (Riepe et al., 1996) und *in vivo* (Rex et al., 1999) zuverlässig registriert, auch irreversible Schäden der neuronalen Funktion wurden genau erfasst (Rex et al., 2001).

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

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

Viele Bemühungen gehen auch dahin, die LIF als diagnostisches Werkzeug zu nutzen. Pathologische Erscheinungen, die zu einer permanenten Veränderungen des lokalen Stoffwechsels führen, eignen sich dazu besonders.

Als Beispiel ist hier der Einsatz von LIF in der Tumordiagnostik zu nennen. Tumorgewebe zeichnet sich stets durch eine höhere Stoffwechselrate als das umgebenden gesunde Gewebe aus. Aufgrund dessen kann die Bestimmung der NADH Fluoreszenz auch zur Abgrenzung tumorösen Gewebes gegenüber gesunden Gewebes genutzt werden (siehe auch 2.2.8, S.24).

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten übereinstimmend von einer erwartungsgemäss niedrigeren NADH Fluoreszenz im tumorösen Gewebe im Vergleich zum gesundem Gewebe. Die Ergebnisse stammen von Rattengliomen, menschlichen Gehirntumoren (Yong et al., 1996) und Harnblasenkarzinomen (König, 1995). Ähnliche Techniken wurden auch zur Beurteilung der Gewebefunktionalität nach ischämischen Perioden eingesetzt (Strong et al., 1996, Thorniley et al., 1994)

Die Fluoreszenzsignale, die mit der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie erfasst werden, spiegeln das intrazellulär vorkommendes NADH wider (siehe S. 10).

Im Rahmen dieser Arbeit entschieden wir uns deshalb für die Laser-induzierte Fluoreszenzspektroskopie zur Bestimmung der NADH Fluoreszenz, da mit dieser Methode spektrale Interferenzen durch andere, lokal vorkommende Fluorophore, weitgehend ausgeschlossen werden können.

Die Laserimpulse sollten keine Auswirkungen auf die Funktionen des Zellverbandes haben. Emittierte Laserstrahlen regen jedoch nicht nur NADH Moleküle zur Fluoreszenz an, sondern auch andere im Gewebe enthaltene endogene Fluorophore. (siehe S.9). In Untersuchungen am Kortex kommen als mögliche „Fremdfluorophore“ vor allem Flavine und NADPH in Frage, in Untersuchungen an der Darmwand außerdem Kollagen.

Flavine zeichnen sich durch eine relativ lange Fluoreszenzabklingzeit aus (siehe Tab.1, S.9), ausserdem liegt ihr Emissionmaximum in einem anderen Größenordnungsbereich als das von NADH. Durch den Einsatz sowohl optischer als auch zeitlicher Filter, die auf NADH spezifische Werte abgestimmt sind, kann man eine „Verunreinigung“ des Fluoreszenzsignales durch Riboflavine ausschließen. Trennung zwischen langlebigen (Flavine) und kurzlebigen (NADH) Fluoreszenzsignalen erreicht man durch den Einsatz eines frühen zeitlichen Fensters.

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

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

## 2.4. Modelle zur Untersuchung der intestinalen Resorption

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

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

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

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

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

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

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

hochaktive Mukosafläche mit dem äußeren Medium, in dem die zu untersuchende Substanz suspendiert ist, direkt in Kontakt tritt. Durch die Flüssigkeitsfüllung des Darmsegmentes wird die aktive Oberfläche vergrößert, die für die Absorption essentiellen Mikrovilli werden gespreizt und der Darmwanddurchmesser reduziert. Außerdem können mehrere Proben gleichzeitig analysiert werden (Wilson et al., 1954). An diesem Modell kann untersucht werden, ob Substanzen von der intestinalen Mukosa resorbiert werden.

Da es sich um ein sehr einfaches Modell handelt, werden am everted gut sac bis heute orientierende Studien bezüglich der Resorbierbarkeit verschiedener Substanzen durchgeführt. Zum Beispiel wurde mit Hilfe dieses Modells die Resorption pflanzlicher Extrakte sowie phytomedizinischer Kombinationen (Kelber et al., 2001), von Hormonen, insbesondere von Testosteron und dessen Derivaten (Arellano et al., 2004) untersucht, sowie der Einsatz von Liposomen zur Verbesserung der Absorption oral verabreichter Pharmaka (Carreno-Gómez et al., 1999).

Die everted gut sac Methode ist aber auf Grund der bereits erwähnten eingeschränkten Sauerstoffversorgung in ihrer Aussagekraft auf ein qualitativ semiquantitatives Niveau, begrenzt. Quantitative Aussagen können nur als Tendenzen formuliert werden.

Auch Wilson und Wiseman waren sich des Umstandes der eingeschränkten Sauerstoffversorgung bewusst, sie konnten jedoch anhand eines einfachen Experimentes beweisen, dass die Sauerstoffversorgung der Mukosa unter den gegebenen Bedingungen ausreichend ist. Einige Versuche wurden statt bei 37°C bei 32°C durchgeführt, währenddessen wurde die Sauerstoffverbrauchsrate und die Milchsäureproduktionsrate gemessen. Die Sauerstoffverbrauchs- und Laktatproduktionsrate der Versuchen bei 37°C unterschieden sich nicht von den bei 32°C durchgeführten Versuchen. Im Falle einer ungenügenden Sauerstoffversorgung hätte man in den Versuchen bei 37°C eine höhere Laktatproduktion als in den Versuchen bei 32°C beobachten müssen.

Histologische Untersuchungen zeigten, dass beim everted gut sac Modell nach ca. 20 Minuten bereits degenerative Veränderungen auftreten, die sich nach 1 Stunde so verstärken, dass man die Versuchsdauer auf 20 –30 Minuten limitieren sollte (Plumb et al., 1987). Bei der Durchführung unserer Versuche richteten wir uns deshalb nach diesen Angaben, und legten eine Versuchsdauer von 30 Minuten fest.

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

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

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

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

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