

## 3. Eigene Untersuchungen

### 3.1. Material und Methoden

#### 3.1.1. Tiermaterial

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

### 3.1.2. Verwendete Substanzen

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

**Tabelle 2:** Angaben zu den benutzten Substanzen

### Genehmigungen

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

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

#### 3.1.3.1. Vorbereitung der verwendeten Substanzen

Als Lösungsmittel wurde in allen Fällen dieses Versuchsabschnittes eine Tyrodelösung nach Kolb (1974) verwendet. Zusammensetzung in %: NaCl = 0,8. KCl = 0,02. CaCl<sub>2</sub> = 0,02. NaHCO<sub>3</sub> = 0,1. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 0,005. MgCl<sub>2</sub> = 0,01 und Aqua bidest. Nicht aufgebrauchte Tyrode Stammlösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag wieder verwendet.

Die zu untersuchenden Substanzen, bzw. Zubereitungen (Diazepam, g-Strophantin, NADH sowie NAD<sup>+</sup>) wurden in Tyrode gelöst (siehe Tab.3 unten).

Die NADH Konzentration entsprach den Dosierungen die bei Ratten im Verhaltensversuch Wirkung gezeigt haben (Rex et al., 2004a, Rex et al., 2004b).

In Voruntersuchungen wurde die Stabilität der selbst hergestellten NADH (10mg/l und 100mg/l) Lösung mittels HPLC untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass die NADH Lösung sowohl bei unterschiedlichen Temperaturen (-85°C, -20°C und 5-8°C) als auch bei verschiedenen pH Werten (7,0 und 8,5) über einen Zeitraum von mindestens einer Woche stabil bleibt.

Aus dieser Beobachtung wird der Schluss gezogen, dass die NADH Lösung sowohl über den Zeitraum des Versuches als auch von einem Tag auf den anderen stabil bleibt, vorausgesetzt sie wird bei den genannten Temperaturen aufbewahrt (Kühlschrank: 5-8°C).

### 3.1.3.2. Versuchsplan

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

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

### 3.1.3.3. Vorbereitung der Apparatur

Die Versuche wurden in einem temperierbaren Wasserbad (Typ M12, Firma Lauda, Lauda Königshofen, Deutschland) bei einer konstanten Temperatur von 38,5°C durchgeführt. Das Becken war mit Leitungswasser gefüllt.

Vor Versuchsbeginn wurden die für einen Versuchstag benötigten externen Inkubationslösungen (100ml) abgemessen. Als Probengefäße verwendeten wir Erlenmeyerkolben (250ml). Die als erstes zum Einsatz kommenden Probengefäße wurden mit Inkubationslösung ca. 15 Minuten vor Versuchsbeginn in das Wasserbad gestellt, um eine Versuchstemperatur von 38,5°C zu erzielen. Vor Beginn eines jeden Versuches wurde die Temperatur der Inkubationslösung erneut geprüft. Die später verwendeten Probengefäße wurden im Kühlschrank zwischengelagert.

Über eine Glaspipette, die durch einen Plastikschlauch mit einer Carbogenflasche verbunden war, wurde jedes Probengefäß bereits in der Aufwärmphase, sowie den gesamten Versuch über, separat mit Carbogen (95% O<sub>2</sub> mit 5% CO<sub>2</sub>) begast.

### 3.1.3.4. Vorbereitung der Gewebeprobe

Zur Untersuchung der Resorptionsquoten von Diazepam, g-Strophantin und NADH verwendeten wir das von Wilson und Wiseman entwickelte *in vitro* Modell des everted gut sac.

Die Ratten wurden durch Inhalation von Isofluran (Baxter GmbH, D-Unterschleißheim) in Narkose gelegt und durch zervikale Dislokation getötet.

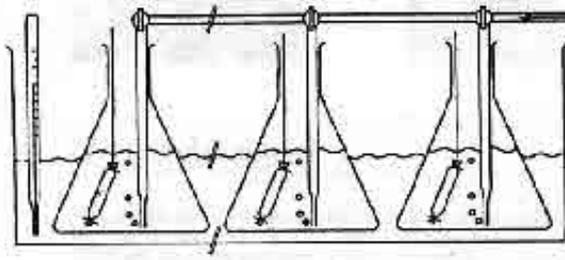
Das Tier wurde in Rückenlage gebracht, die Bauchdecke entlang des Rippenbogens und beidseits nach kaudal bis zur Inguinalregion eröffnet. Der Dünndarm wurde magenseitig abgeklemmt, bis zum Caecum freigelegt, komplett entfernt und augenblicklich in eine mit Carbogen begaste auf 38,5°C temperierte Tyrodelösung verbracht.

Anschließend wurde ein circa 15cm langes Darmstück vom Restdarm durch Scherenschnitt getrennt und wiederholt mit 38,5°C warmer Tyrodelösung gespült.

Während der Durchführung der folgenden Schritte befand sich das Darmsegment in einer mit Tyrodelösung (38,5°C) gefüllten Petrischale.

Ein Ende des isolierten Darmstückes wurde so geschnitten, dass es schräg ausläuft. Am apikalen Punkt wurde eine Ligatur mit langen überstehenden Fäden befestigt. Vom

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



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

### 3.1.3.5. Versuchsdurchführung

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

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

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

A = zu Beginn des Versuches aus der externen Inkubationslösung.

B = bei Versuchsende aus der externen Inkubationslösung.

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

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

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

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

#### **Diazepam**

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

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

Detektion von Diazepam wurde ein UV-Detektor (Knauer, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 232 nm verwendet.

Die Auswertung des Chromatogramms erfolgte unter Anwendung eines chromatographischen Datensystems (Chromatographiedatensystem CSW – Data Apex, Tschechien). Die Konzentrationsbestimmung von Diazepam in der Perfusaten wurde anhand einer vorher erstellten Eichkurve berechnet.

### **g-Strophantin**

Probenvorbereitung, HPLC System und stationäre Phase waren identisch mit den für Diazepam beschriebenen Verfahren.

Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Wasser und Azetonitril im Verhältnis 85 zu 15 verwendet. Das Elutionsmittel wurde zuvor gefiltert (Porengröße 42 $\mu$ ) und entgast (10 Minuten im Ultraschallbad). Die Fließgeschwindigkeit betrug 250 $\mu$ l/min. Der Trennvorgang fand bei einer Temperatur von 37°C statt. Die Signaldetektion wurde bei einer Wellenlänge von 220nm vorgenommen.

Die Konzentration von g-Strophantin in den Perfusaten wurde anhand einer vorher erstellten Eichkurve berechnet.

### **NADH**

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

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

### **3.1.3.7. Versuchsauswertung und Statistik**

Für jede Substanz wurde eine Eichkurve erstellt. Vor jedem Versuch wurde eine Einpunkteichung durchgeführt.

Jede Probe wurde durch zwei Messwerte charakterisiert. Einerseits aus dem Messwert der externen Flüssigkeit (Inkubationslösung). Sowie andererseits aus dem Messwert der internen Lösung (Flüssigkeit, die aus dem Darmpräparat isoliert wurde) zum Zeitpunkt des Versuchsendes. Als Referenzpunkt dienten die Werte der externen Lösung.

Die zu Versuchsbeginn in die externe Lösung verabreichte Substanzmenge ist die maximal mögliche Konzentration, die resorbiert werden kann, deshalb wurde dieser Wert als 100% Marke angesehen.

Die Resorptionsquote (R) wurde nach folgender Formel berechnet:

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

Der Quotient von innerer und äußerer Konzentration stellt die Resorptionsquote nach 30 Minuten dar.

Die Nullhypothese „ es liegt eine Normalverteilung vor“ wurde abgelehnt. Da man in diesem Fall davon ausgehen kann, dass die Verhältnisse nicht symmetrisch verteilt sind, wurden die Werte als Median und 25./75. Perzentile dargestellt.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der Rangvarianz-Analyse nach Kruskal Wallis und dem Dunn's Test.

### **3.1.4. Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte nach sublingualer Verabreichung verschiedener NADH und NAD<sup>+</sup> Konzentrationen.**

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

#### **3.1.4.1. Vorbereitung der verwendeten Substanzen**

In diesem Abschnitt wurden drei verschiedene NADH- und drei verschiedene NAD<sup>+</sup> Dosen untersucht. Für den Dosisbereich NADH 10mg/kg verwendeten wir die über das Birkmayer-Labor bezogenen „ENADAlert® 10mg sublingual“ Tabletten. Dem Gewicht des Versuchstieres entsprechend wurde eine Teilmenge der Tablette zerkleinert und sublingual verabreicht.

Für die Dosisbereiche NADH 50 und 100mg/kg stellten wir eine entsprechend konzentrierte NADH Lösung für jeden Versuch frisch her. Die benötigte Menge NADH Reinsubstanz wurde abgewogen und in 0,1ml Natrium Chlorid Lösung suspendiert. Nach dem gleichen Prinzip wurde die jeweils benötigte NAD<sup>+</sup> Lösung hergestellt.

#### **3.1.4.2. Messapparatur**

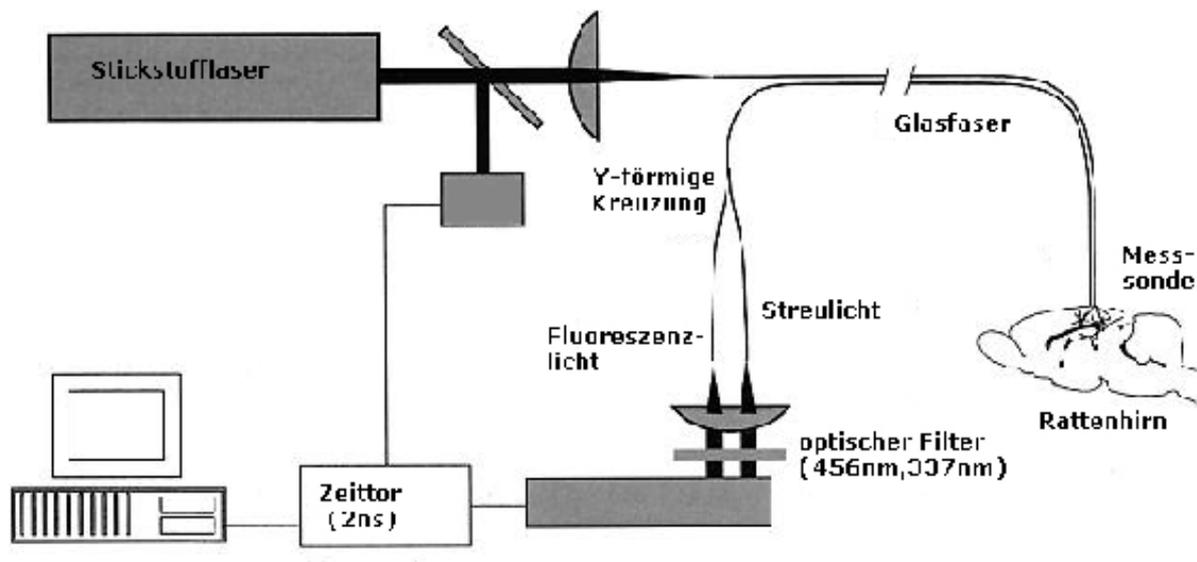
Zur Messung der NADH Fluoreszenz verwendeten wir einen Laserfluoroskop vom Typ LF 402 Metabolic der Firma IOM Berlin, Deutschland.

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

Die Impulsenergie des Laserstrahls im Gerät beträgt  $100\mu\text{J}$ , am Sondenausgang dagegen nur noch  $1\mu\text{J}$ .

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

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



**Abb.6:** Schematischer Aufbau eines Laserfluorosopes

### **3.1.4.3. Vorbereitung und Wartung des Gerätes**

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

### **3.1.4.4. Versuchsvorbereitung**

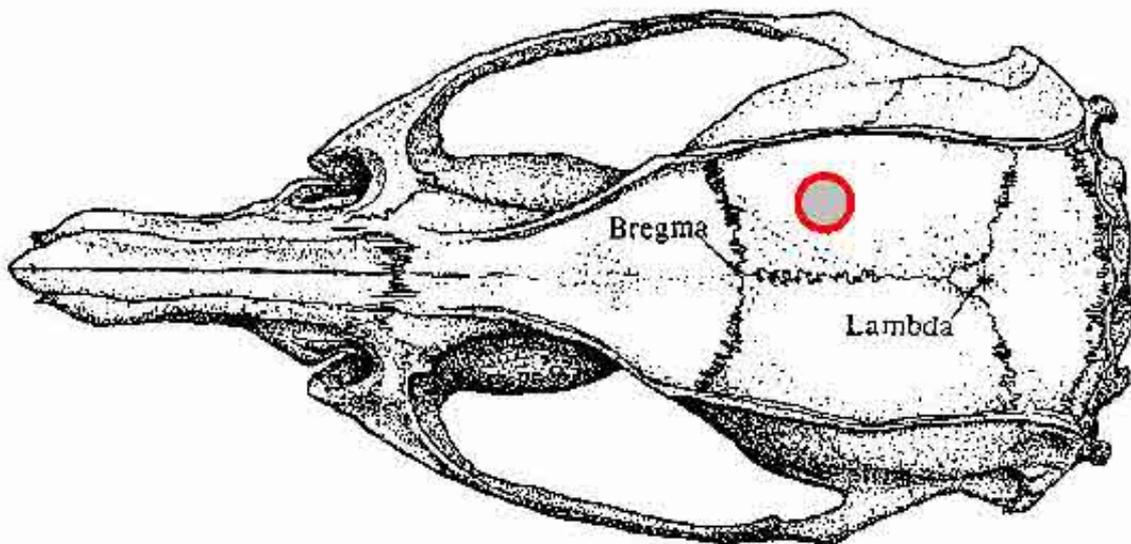
Zur Durchführung der *in vivo* Versuche benötigten wir eine Narkose, die mindestens 3h aufrecht erhalten werden konnte. Wir entschieden uns für eine Kombination aus Chloralhydrat, Atropin und Ketamin. Chloralhydrat (Chloral Hydrate CIV, SIGMA-Aldrich Chemie, D-Steinheim) wurde in einer Dosis von 375mg/kg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

Chloralhydrat hat im Vergleich zu anderen Narkotika eine Wirkdauer von mehreren Stunden. Es kann jedoch die Atmung empfindlich beeinträchtigen, da es das Atemzentrum hemmt. Verminderte Kontraktilität des Myokards und Bradykardie werden ebenfalls beobachtet (Skarda et al., 1997).

Zum Ausschalten des Schmerzempfindens und um eine Dosisreduktion des Narkotikums zu erreichen, wurde zusätzlich Ketamin verabreicht. Ketamin bewirkt eine nach wenigen Minuten eintretende Analgesie, es verfügt über keine nennenswerte atemdepressive Wirkung, sondern wirkt im Gegenteil eher stimulierend auf Herz- und Kreislaufsystem. Ketamin kann beliebig oft nachdosiert werden; man verabreicht dann  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{1}{3}$  der Initialdosis. Zum Abschätzen der Narkosetiefe wurden während des Versuches in regelmäßigen Abständen die Atemfrequenz, der Kornealreflex und der Zwischenzehenreflex kontrolliert, davon abhängig, jedoch maximal nach 90 Minuten, wurde Ketamin nachdosiert.

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

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



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

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

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

einem in isotoner Kochsalzlösung getränkten Tupfer bedeckt, der in regelmäßigen Abständen nachbefeuchtet wurde.

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

#### **3.1.4.5. Versuchsdurchführung**

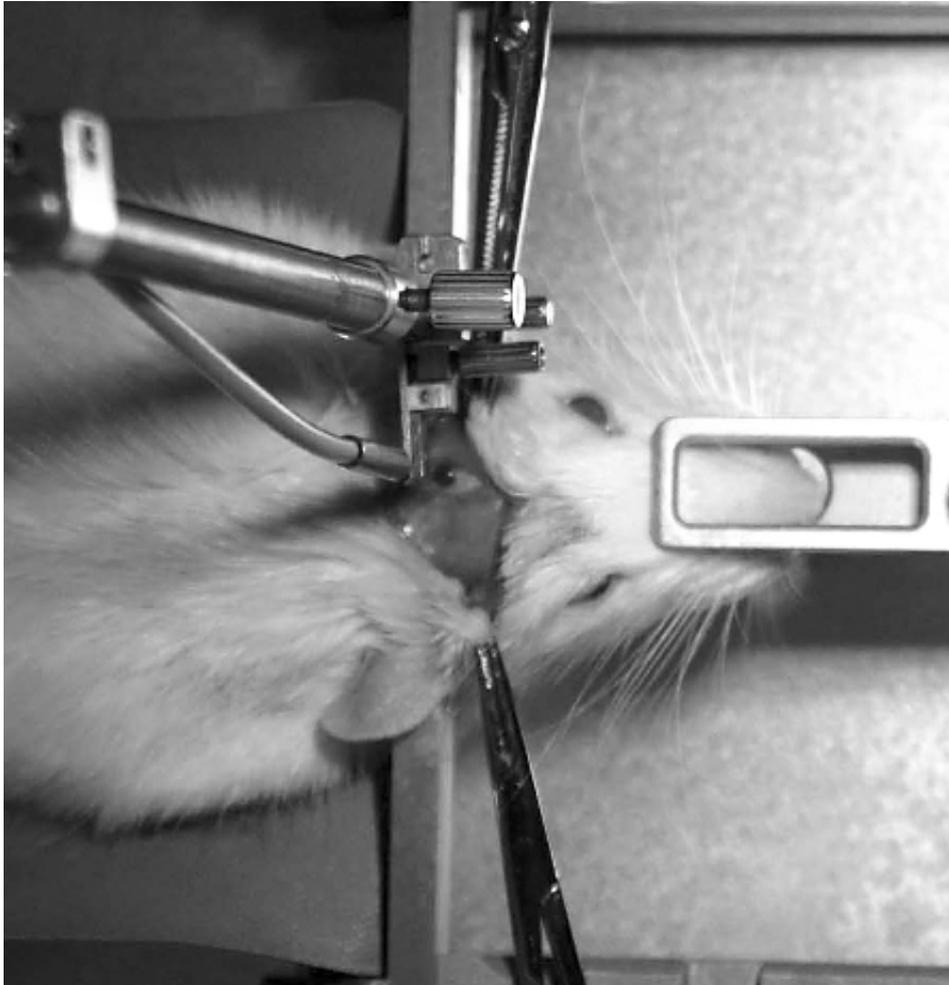
In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir zur Messung der NADH Fluoreszenz im Kortex der narkotisierten Ratte die von Beuthan et al., 1990, Fink et al., 1993 und Rex et al., 1999 validierte Methode der Laser-induzierten Fluoreszenzspektroskopie.

NADH ist ein ubiquitärer Bestandteil jeder Zelle, demzufolge wird man im Falle einer NADH Fluoreszenzmessung *in vivo* immer ein Fluoreszenzsignal detektieren. Die Frage ist allerdings, ob infolge einer externen Verabreichung von NADH eine Zunahme dieses Signals zu beobachten ist.

Voraussetzung ist die Aufzeichnung der NADH Fluoreszenz *in vivo* unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Zugabe von Substanzen, welche die NADH Fluoreszenz beeinflussen könnten. Zu diesem Zweck führten wir Kontrollversuche durch, bei denen, ohne Zugabe von Substanzen, ausschließlich die basale NADH Fluoreszenz und Streulicht im Kortex über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen wurde.

Die chirurgische Versuchsvorbereitung verursacht eine vorübergehende Traumatisierung des Hirngewebes, was sich in einer schwankenden NADH Konzentration bzw. Fluoreszenzsignal bemerkbar macht. Die Fluoreszenzmessung beginnt in dem Moment beginnt, in dem die Lasersonde mit dem Hirngewebe in Kontakt tritt. Aufgrund der genannten Schwankungen des Fluoreszenzsignals wurden alle Versuche erst nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignales begonnen (etwa 30 Minuten nach Implantation der Lasersonde). Als Versuchsbeginn gilt deshalb der Zeitpunkt an dem NADH sublingual verabreicht wurde (30 Minuten nach Implantation der Lasersonde). Zur Auswertung und zur

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



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

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

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

physiologische NADH Fluoreszenz registriert. Diese Messungen wurden als Kontrollwerte bezeichnet.

Um den angestrebten Vergleich zwischen physiologischer NADH Fluoreszenz und durch externe Verabreichung von NADH möglicherweise gesteigerter NADH Fluoreszenz durchführen zu können, wurden drei verschiedene NADH und NAD<sup>+</sup> Dosen sublingual verabreicht: 10, 50 und 100mg/kg. Diese Untersuchungen wurden an insgesamt 6 Gruppen durchgeführt. (Die Messungen der physiologischen NADH Fluoreszenz sowie der NADH Fluoreszenz nach Vorbehandlung mit NADH und NAD<sup>+</sup> erfolgte nicht am gleichen Tier).

Die Gruppengröße pro Substanz und Konzentration, einschließlich Kontrollen, betrug 10 Tiere. Die Versuche erfolgten randomisiert.

NAD<sup>+</sup> wurde deshalb als Testsubstanz verwendet, weil wir überprüfen wollten, ob eine NAD<sup>+</sup> Gabe die kortikale NADH Fluoreszenz beeinflusst. NADH in einer Dosierung von 10mg/kg wurde zu Versuchsbeginn sublingual bzw. sublingual und buccal verabreicht. Über einen Zeitraum von 120 Minuten wurden NADH Fluoreszenz und Streulicht gemessen.

Für die Dosisbereiche NADH 50 und 100mg/kg wurde eine entsprechend konzentrierte NADH Lösung frisch zubereitet. 0,1ml der jeweiligen Lösung wurden über eine Mikrodialysepumpe (CMA/102, Schweden) sublingual verabreicht. Die Verbindung zwischen Spritze und Sublingualraum wurde über einen FEP Schlauch (fluoriertes Ethylenpropylen) hergestellt. Die NADH Lösung wurde in einer Geschwindigkeit von 15µl/min verabreicht. Vom Moment der Verabreichung wurden NADH Fluoreszenz und Streulicht über einen Zeitraum von 120 Minuten im Kortex der Ratte gemessen.

Analog zur Durchführung der Versuche mit NADH wurden in den Versuchen mit NAD<sup>+</sup> die in Abschnitt 3.1.4.1. beschriebenen NAD<sup>+</sup> Lösungen (10, 50 und 100mg/kg) über eine automatische Mikrodialysepumpe in den Sublingualraum einer narkotisierten Ratte geleitet, anschließend wurde die kortikale NADH Fluoreszenz über einen Zeitraum von 120 Minuten gemessen.

Nach Versuchsende wurde die Ratte durch intrakardiale Applikation einer letalen Dosis Chloralhydrat (2g/kg) euthanasiert. Die Messung wurde noch 15-30 Minuten nach Gabe desselben fortgeführt.

### 3.1.4.6. Versuchsauswertung und Statistik

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ergänzend wurde die Fluoreszenzveränderung (von 0 – 120 Minuten nach NADH Applikation) in Abhängigkeit der Dosis auch als Fläche unter der Kurve dargestellt (area under the curve, AUC). Die Fläche unter der Kurve wurde nach der Trapezregel ( $AUC = \sum_{i=1}^n (x_{i+1} - x_i) \cdot \left( y_i + \frac{1}{2}(y_{i+1} - y_i) \right)$ ) ermittelt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Programmes Sigma Plot 8.0

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

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

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

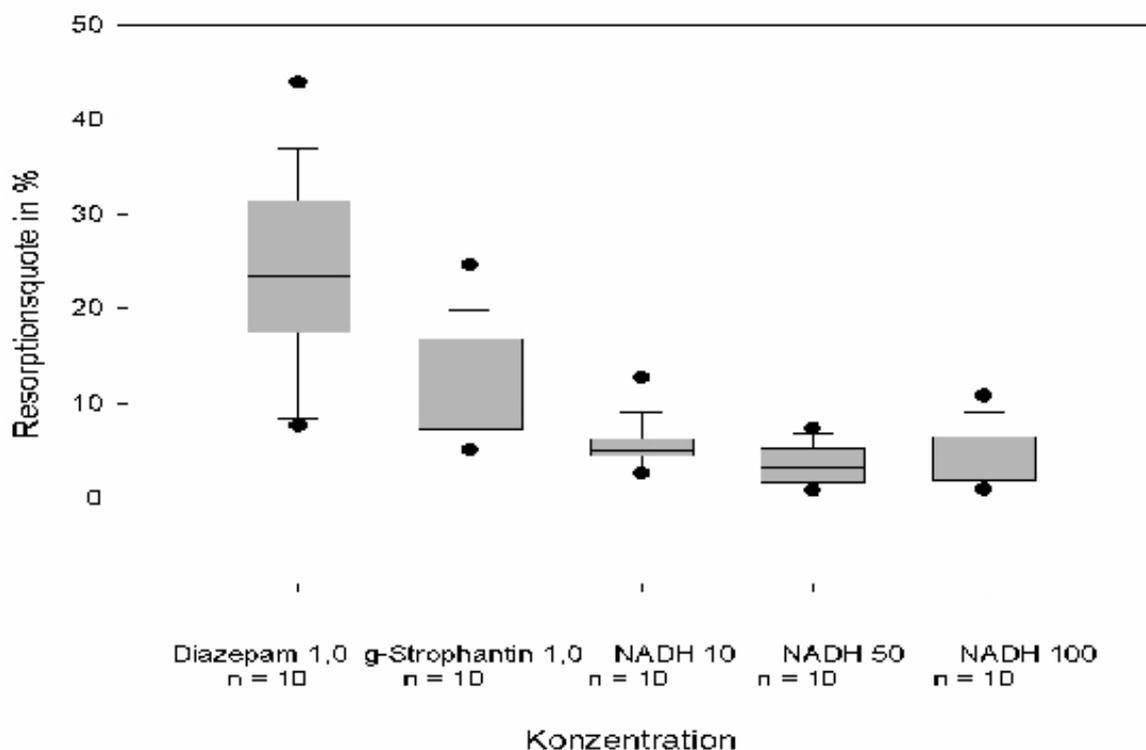
## 3.2. Versuchsergebnisse

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

Everted gut sac Darmpräparate wurden in Diazepam (1mg/l), g-Strophantin (1mg/l) und NADH Lösung (10,50 und 100mg/l) über einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration der jeweiligen Substanz sowohl in der Inkubationslösung (B) als auch in der luminalen Flüssigkeit (C) mittels HPLC bestimmt.

Die Resorptionsquote wurde durch Berechnung des Quotienten C/B ermittelt. Abbildung 9 zeigt die Resorptionsquoten von Diazepam, Strophantin und NADH im Vergleich.

Diazepam wurde im Durchschnitt nach 30 minütiger Versuchsdauer zu  $23,44 \pm 2,25\%$  resorbiert, g-Strophantin hingegen wurde in derselben Zeit nur zu  $11,78 \pm 1,33\%$  resorbiert. Für NADH liegt die Resorptionsquote aller untersuchten Konzentrationen unterhalb der für g-Strophantin ermittelten Werte. Für die Konzentrationsbereiche NADH 10mg/l, 50mg/l und 100mg/l wurde eine respektive Resorptionsquote von  $5,64 \pm 0,53\%$ ,  $3,57 \pm 0,51\%$  und  $4,71 \pm 0,8\%$  gemessen.



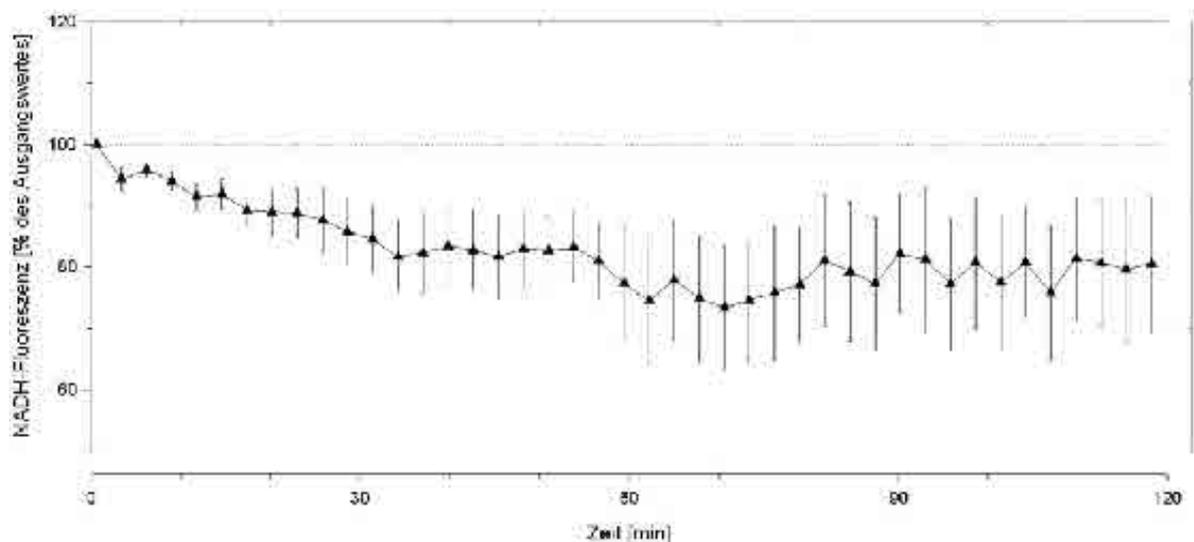
**Abb.9:** Vergleichende Darstellung der Resorptionsquoten (C/B) in % von Diazepam, g-Strophantin, NADH 10mg/l, NADH 50mg/l und NADH 100mg/l. Die Daten wurden am everted gut sac Modell *in vitro*, nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten ermittelt. Angegeben sind Mediane mit 25./75. Perzentile; n pro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

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

#### 3.2.2.1. Messung der kortikalen NADH Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen

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

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



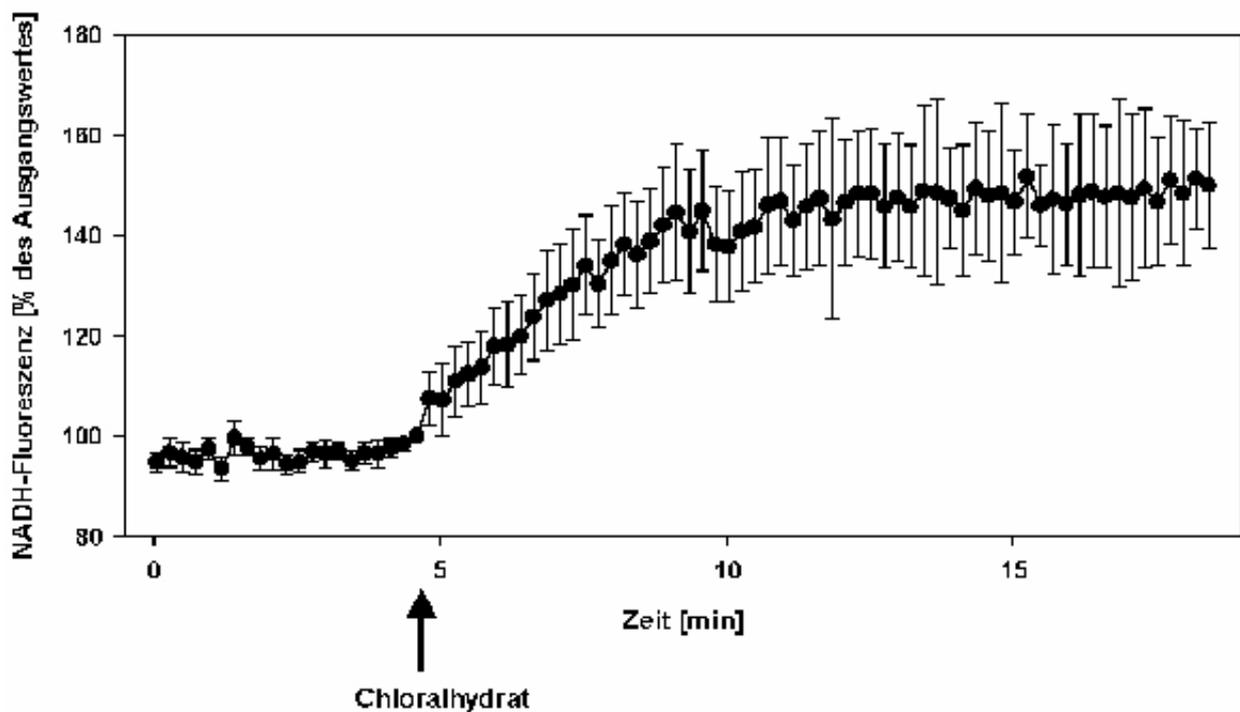
**Abb.10:**

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

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

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

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



**Abb.11:**

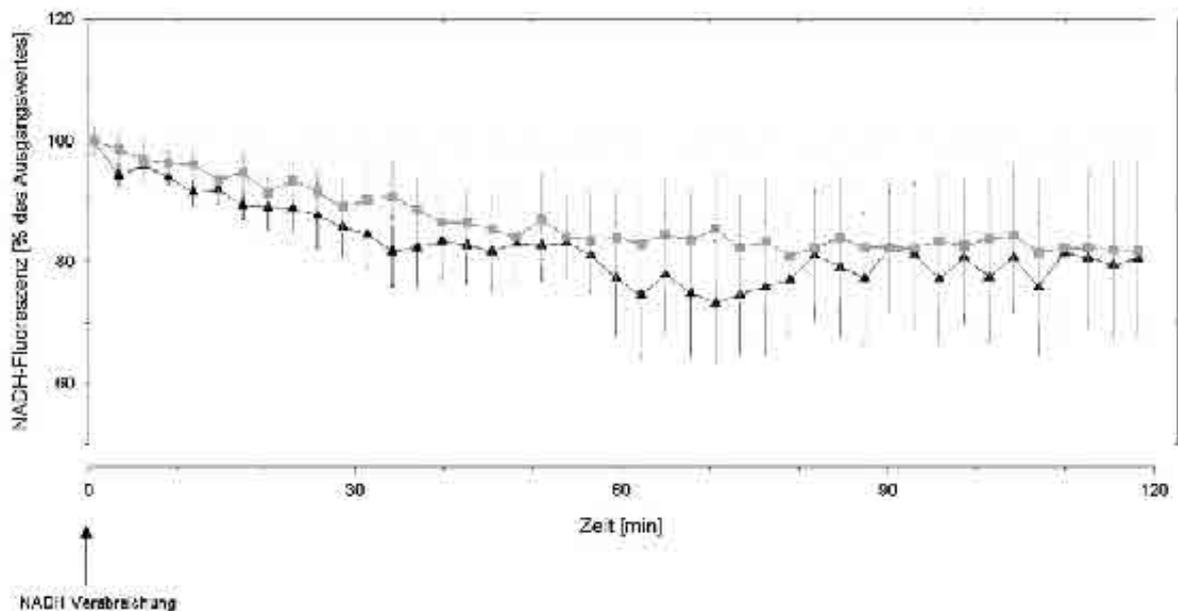
Wirkung einer letalen Dosis Chloralhydrat auf die kortikale NADH-Fluoreszenz. Chloralhydrat wurde zum Zeitpunkt 0 verabreicht. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n = 10).

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

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

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

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



**Abb.12:**

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

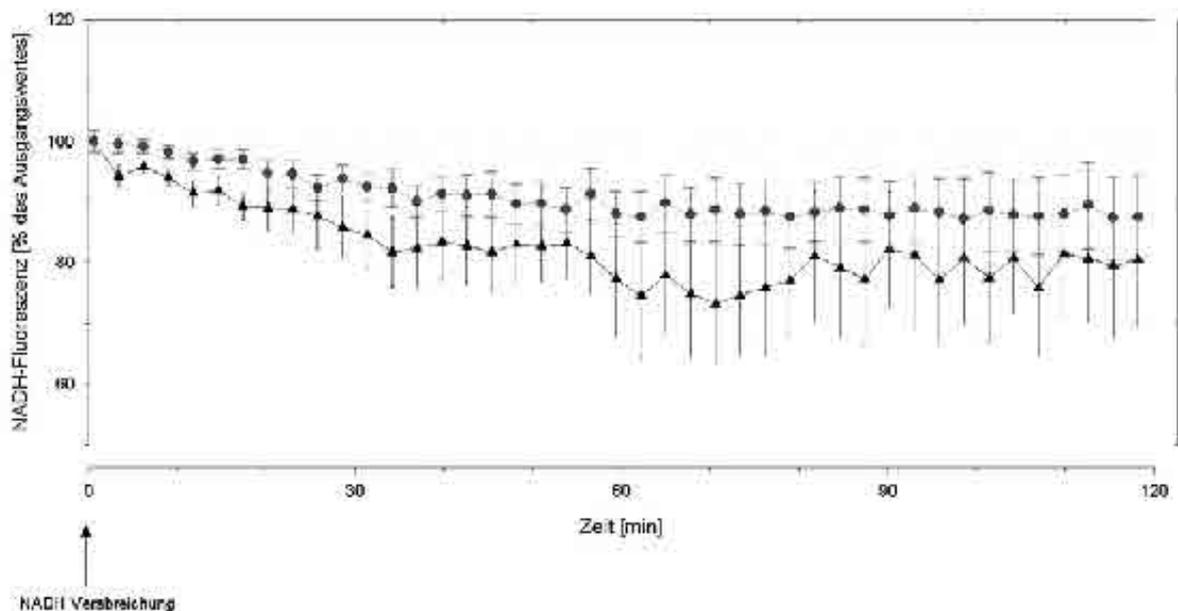
### 3.2.2.4. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NADH 50mg/kg

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

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

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

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



**Abb.13:**

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

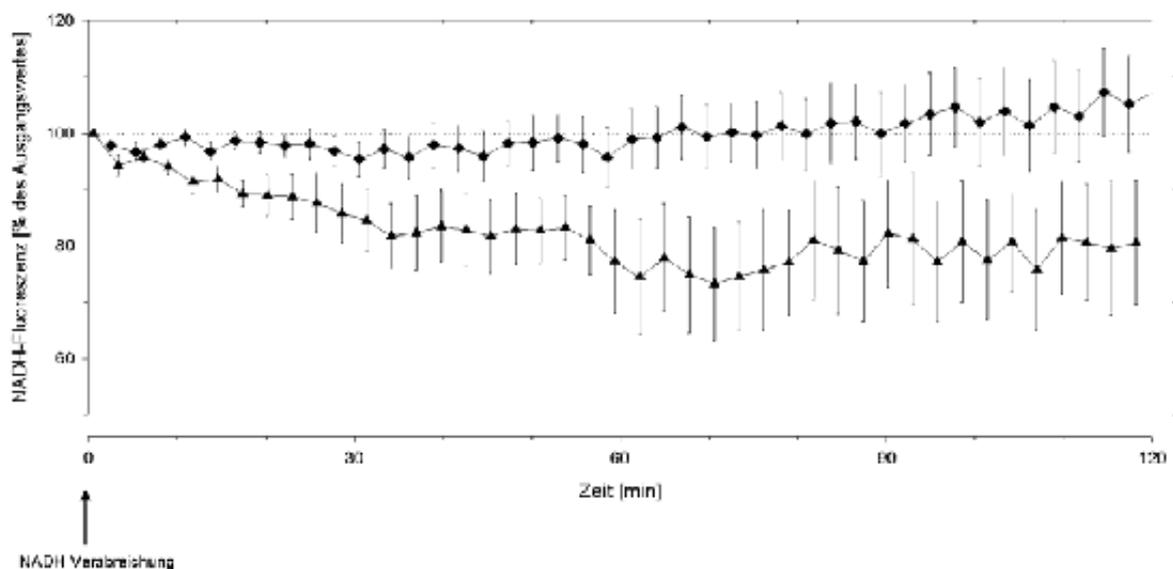
### 3.2.2.5. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NADH 100mg/kg

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

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

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

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



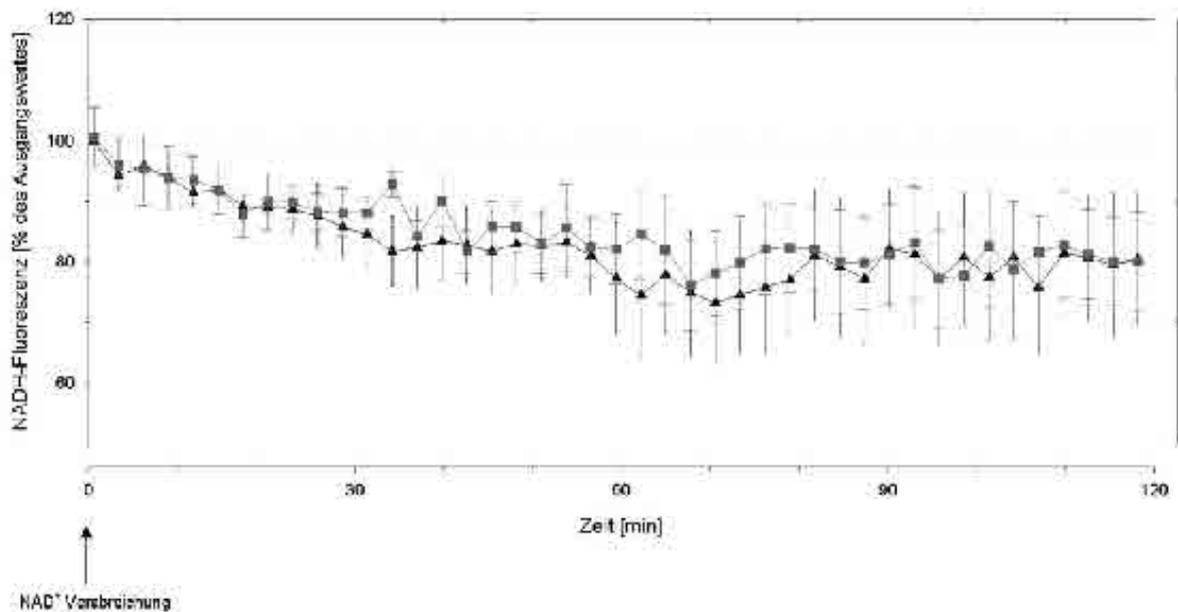
**Abb.14:**

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

### 3.2.2.6. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NAD<sup>+</sup> 10mg/kg

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

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



**Abb.15:**

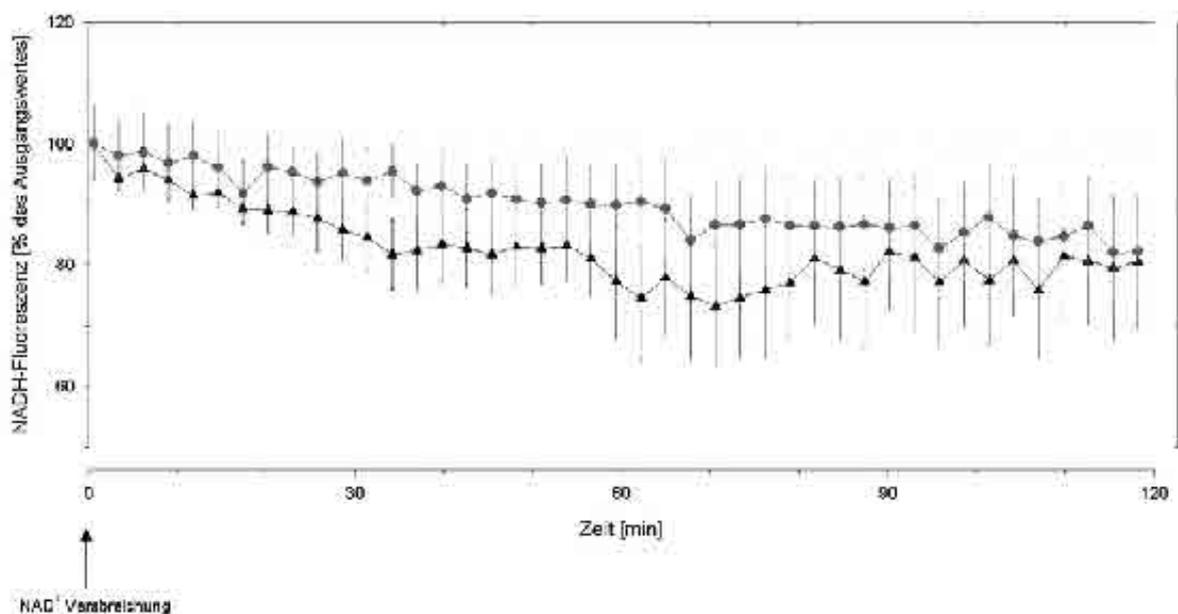
Wirkung einer sublingual applizierten NAD<sup>+</sup> Lösung (Dosis: 10mg/kg) auf die kortikale NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt (n pro Gruppe = 10). ■ = NAD<sup>+</sup> 10mg/kg. ▲ = Kontrollen.

### 3.2.2.7. Veränderung der NADH Fluoreszenz nach Verabreichung einer Dosis NAD<sup>+</sup> 50mg/kg

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

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

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



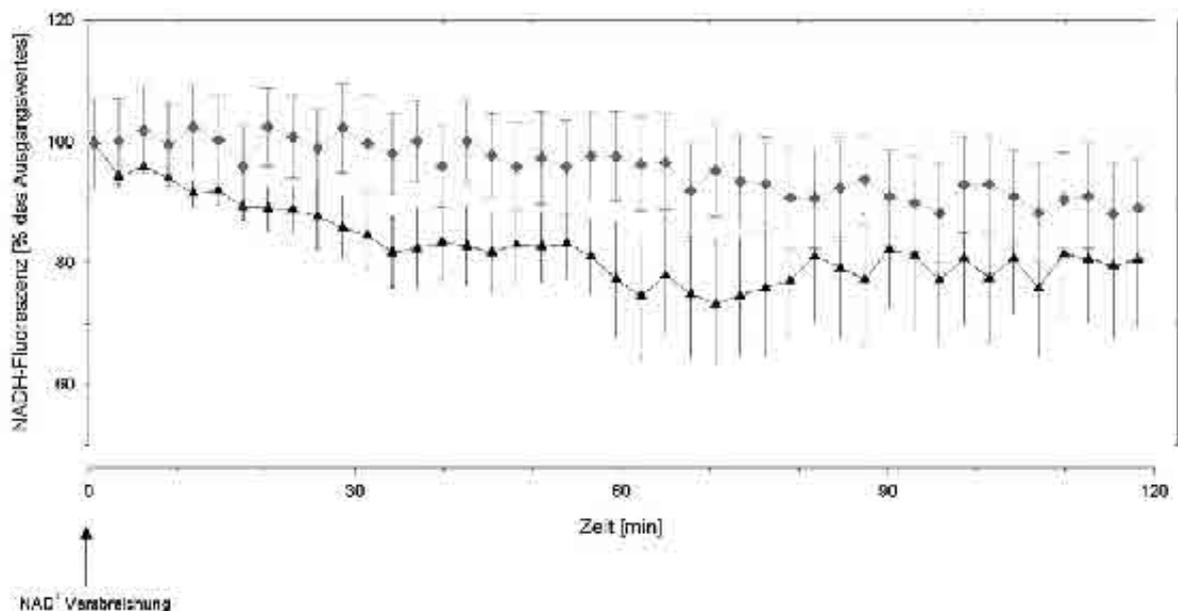
**Abb.16:**

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

### 3.2.2.8. Veränderung der NADH Fluoreszenzmessung nach Verabreichung einer Dosis NAD<sup>+</sup> 100mg/kg

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

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



**Abb.17:**

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

### 3.2.2.9. Zusammenfassung der *in vivo* Versuchsergebnisse

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

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

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

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

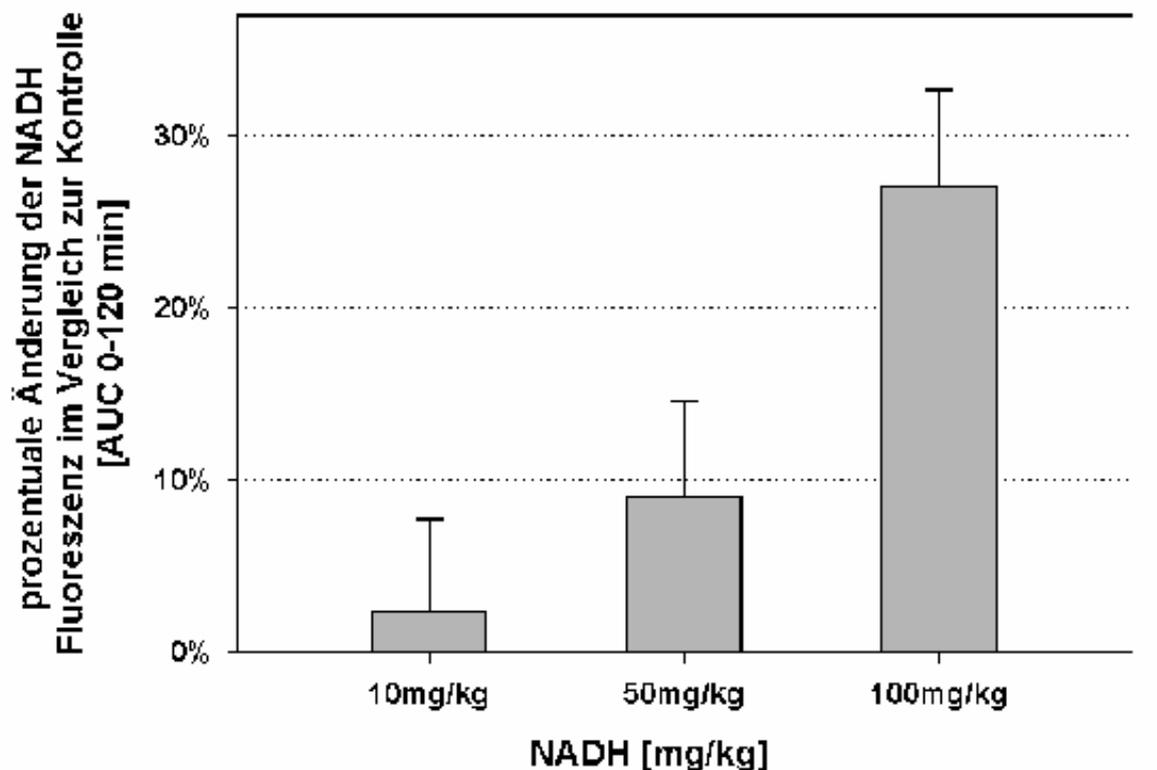
NAD<sup>+</sup> sublingual in einer Dosis von 100mg/kg führte zu einem tendenziellen Anstieg der NADH Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollmessungen.

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

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

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

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



**Abb.18:**

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

### 3.2.3.11. Darstellung der NADH Fluoreszenzzunahme als Fläche unter der Kurve nach sublingualer NAD<sup>+</sup> Verabreichung

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

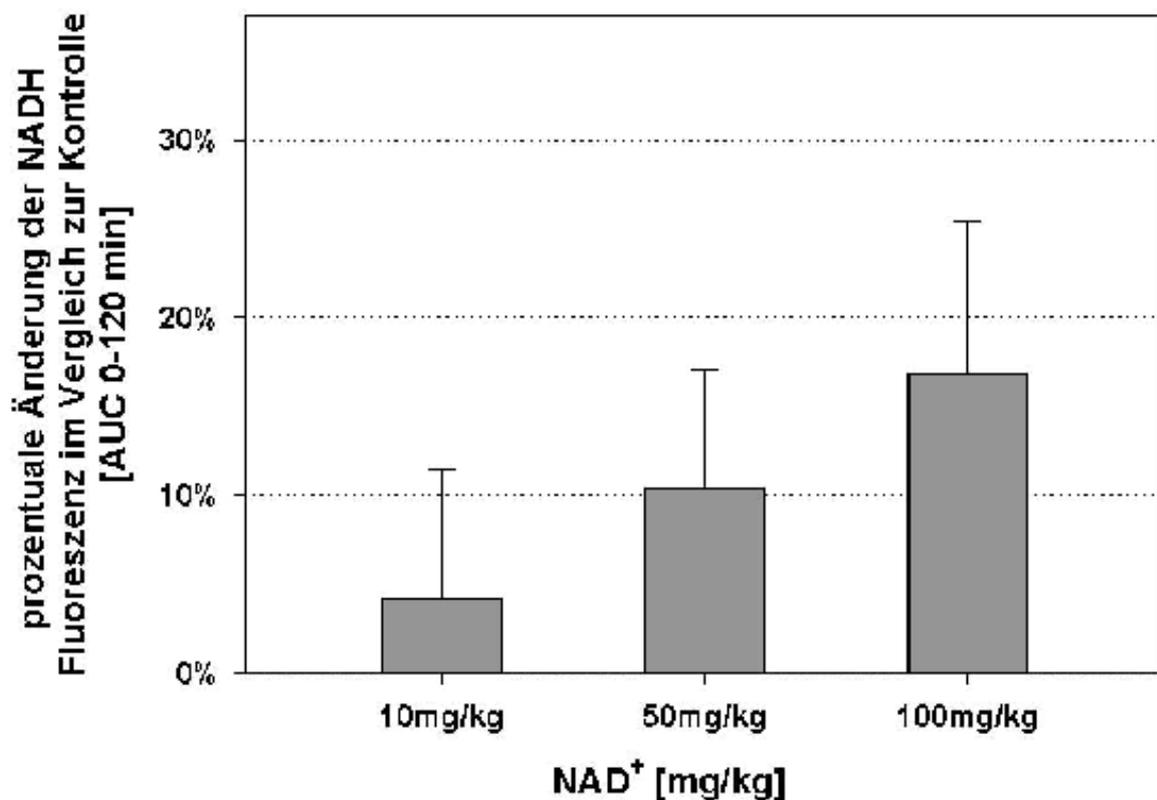


Abb.19:

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