

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Vitamin E Supplementierung bei Alzheimer Patienten

Auswirkung auf die Antioxidantien in Plasma und Liquor cerebrospinalis

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Charlotte Maria Ganders
aus Hamburg

Hamburg
2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 03.11.2009

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. V. Müller

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Reimers

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zielsetzung	3
2. Einleitung	4
2.1. Die Alzheimersche Erkrankung.....	4
2.1.1. Einführung.....	4
2.1.2. Epidemiologie.....	5
2.1.3. Klinische Kriterien und Diagnostik.....	6
2.1.4. Pathogenese und Äthiologie.....	6
2.2. Oxidationsvorgänge in vivo.....	9
2.2.1. Oxidation und freie Radikale.....	9
2.2.2. Lipoproteine.....	10
2.2.3. Lipidperoxidation.....	11
2.3. Oxidationskinetik des Liquors.....	12
2.4. Antioxidantien.....	13
2.4.1. Hydrophile Antioxidantien.....	13
2.4.2. Lipophile Antioxidantien.....	15
3. Material und Methoden	17
3.1. Geräte.....	17
3.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	18
3.3. Gewinnung und Vorbereitung des Probenmaterials.....	18
3.4. Das Patientenkollektiv.....	18
3.5. Messung der oxidativen Parameter im Plasma.....	19
3.5.1. Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien.....	20
3.5.1.1. Bestimmung der Ascorbinsäure Konzentration.....	20
3.5.1.2. Bestimmung der Urat Konzentration.....	21
3.5.1.3. Bestimmung der Sulfhydrylgruppen Konzentration.....	21
3.5.1.4. Bestimmung der Bilirubinkonzentration.....	22
3.5.2. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien.....	23
3.5.3. Bestimmung der Fettsäurekonzentration.....	24
3.5.4. Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration.....	25
3.5.4.1. Bestimmung der Triglyceridkonzentration.....	25
3.5.4.2. Bestimmung der Gesamtcholesterinkonzentration.....	25
3.5.5. Bestimmung der Plasmaoxidierbarkeit.....	25
3.6. Messung der oxidativen Parameter im Liquor cerebrospinalis.....	26
3.6.1. Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien.....	26
3.6.2. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien.....	26
3.6.3. Bestimmung der Fettsäuren und des Gesamtcholesterins.....	27
3.6.4. Bestimmung der Liquoroxidierbarkeit.....	28
3.7. Statistische Auswertung der Daten.....	28
4. Ergebnisse	28
4.1. Die Studienpopulation.....	28
4.2. Die hydrophilen Antioxidantien im Plasma.....	29
4.3. Die lipophilen Antioxidantien im Plasma.....	31
4.4. Die Plasma Lipide.....	33
4.5. Die Plasmaoxidierbarkeit.....	33
4.6. Die hydrophilen Antioxidantien im Liquor cerebrospinalis.....	35
4.7. Die lipophilen Antioxidantien im Liquor cerebrospinalis.....	36
4.8. Die Liquor Lipide.....	38
4.9. Die Liquoroxidierbarkeit.....	39
5. Diskussion	42
6. Zusammenfassung	49
7. Literaturverzeichnis	50

Abkürzungsverzeichnis

α -Toc	α -Tocopherol
AAPH	Cu(II),2,2'-azobis-(2-midinpropan)Hydrochlorid
AD	Alzheimer's Disease
AGE	Advanced Glycation Endproduct
APO E	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
A β	Amyloid β
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CSF	Cerebrospinal Fluid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoylsäure)
GC-FID	Gaschromtography-Flame-Ionisation-Detection
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
LDL	Low Density Lipoprotein
MUFA	Mono Unsaturated Fatty Acid
NFT	Neurofibrillary Tangles
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Commu- nicative Disorders-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PBS	Phospat Buffered Saline
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, inwieweit nutritive Supplementierung mit Vitamin E bei Alzheimer Patienten zu einem therapeutischen Effekt führt.

Der Schwerpunkt der Betrachtung liegt dabei auf den biochemischen Auswirkungen im Sinne einer Senkung der Lipoproteinoxidation, die wie in der Einleitung erläutert wird, in großem Maße für die spezifischen intrazerebralen Veränderungen der Alzheimer Patienten verantwortlich gemacht wird. Das Ziel der Untersuchung war es nicht, Auswirkungen auf den klinischen Status der supplementierten Patienten zu erfassen.

Zunächst soll geprüft werden, ob ein oral verabreichtes lipophiles Antioxidans wie Vitamin E (α -Tocopherol) tatsächlich in den Liquor cerebrospinalis (CSF) gelangt, und ob dann mit den etablierten Meßmethoden eine antioxidative Wirkung festgestellt werden kann, d.h. die Plasma- und Liquor Oxidation abnimmt.

Eine parallele Messung von hydrophilen und lipophilen Antioxidantien sowohl im Blutplasma, als auch im Liquor wird durchgeführt vor dem Hintergrund, daß noch sehr wenig über die Verteilungsmechanismen und die Passage der Blut-Hirn-Schranke dieser Substanzen bekannt ist, so daß ein Vergleich von Konzentrationen in Plasma und Liquor wichtige Hinweise auf Verteilungsvorgänge liefern kann.

Des Weiteren wäre es wünschenswert, symmetrische Verteilungen in beiden Kompartimenten nachzuweisen, da sich eine Überprüfung des Therapieeffektes damit auf das Plasma beschränken könnte, welches einfacher zu gewinnen und damit für den Patienten weniger belastend wäre.

Somit ergeben sich folgende Fragestellungen:

Hat die orale Vitamin E Supplementierung einen Einfluss auf die Oxidationsvorgänge im Plasma und CSF, kann die Rate der Lipidoxidation gemindert werden?

Kann nach Vitamin E Supplementierung ein signifikanter Anstieg der Konzentrationen von α -Toc im Plasma und im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden?

Hat die Verabreichung *eines* Antioxidans Auswirkungen auf die Konzentrationen der übrigen Antioxidantien im Sinne einer Akkumulation, bzw. einer protektiven Wirkung?

Lassen sich Plasma- und Liquorkonzentrationen der Antioxidantien an zwei Zeitpunkten signifikant korrelieren?

2. Einleitung

2.1. Die Alzheimersche Erkrankung

2.1.1. Einführung

Die Alzheimer Demenz, eine progredient verlaufende neurodegenerative Erkrankung, ist in den letzten Jahren zunehmend in das Blickfeld des öffentlichen Interesses und der wissenschaftlichen Forschung gerückt.

Seit der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer 1907 erstmals detailliert das Auftreten einer sogenannten „progressiven Demenz“ beschrieb, sind unzählige Thesen und Erklärungsversuche zu Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung unternommen worden.

Alzheimer selbst beschrieb zunächst nur den klinischen Krankheitsverlauf und die Pathomorphologie der Gehirne der an der später nach ihm benannten Erkrankung verstorbenen Patienten.

Die morphologischen Charakteristika bestehen zum Ersten aus den typischen Neurofibrillen, die sich mit Silberfärbung histologisch darstellen lassen, zweitens aus spezifischen strukturellen Veränderungen, die im Folgenden als senile Plaques bezeichnet wurden und drittens aus dem Verlust kortikaler Neuronen.

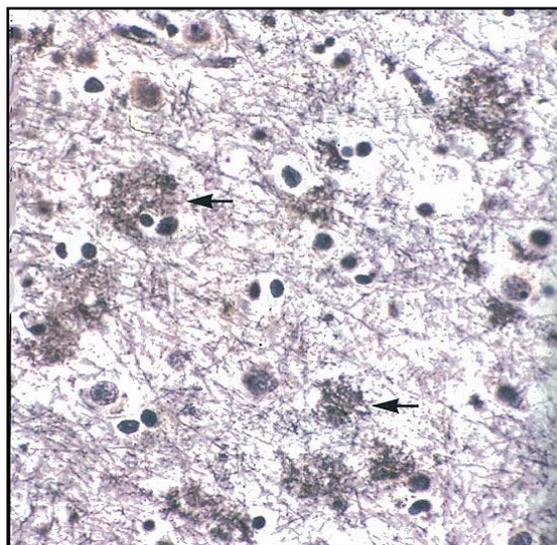


Abb.1: Alzheimer Plaque, Silberfärbung (aus: C.Thomas, Histopathologie, Schattauer Vrlg., 2001)

Während Anfang des Jahrhunderts cerebrale Arteriosklerose als ursächlich für die Erkrankung angesehen wurde, begann die Wissenschaft erst in den 60er und 70er Jahren den Morbus Alzheimer (Alzheimer`s disease, AD) als eigene Entität mit eigenen Ursachen anzusehen (Markesbery et al., 1996)

2.1.2. Epidemiologie

In Deutschland sind von den ca. 1,5 Millionen an einer Demenz leidenden Menschen 60-70% vom Morbus Alzheimer betroffen, die restlichen 30-40% verteilen sich auf vaskuläre Demenzen, andere neurodegenerative Erkrankungen, systemische Grundkrankheiten sowie intracerebrale Raumforderungen.

Die AD steht an vierter Stelle der Todesursachen in der westlichen Hemisphäre, nur noch übertroffen von kardiovaskulären, apoplektischen und onkologischen Erkrankungen.

Die Prävalenz ist deutlich altersabhängig und zeigt bei dem sogenannten late-onset-Typ (> 65) ab dem 7. Lebensjahrzehnt einen steilen Anstieg, die Rate liegt hier bei 3,2%, bei den über 80jährigen schon bei 10,8% (Lautenschlager et al.,1999).



Abb.2: prominente Alzheimer Patientin Rita Hayworth
(aus: Möller/Laux/Deister, Psychiatrie, Hippokrates
Vrlg., 1995)

2.1.3. Klinische Kriterien und Diagnostik

Die Diagnose der AD wird anhand standardisierter Diagnosekriterien im Sinne einer Ausschlußdiagnose gestellt, wobei der endgültige Nachweis für das Vorliegen der Erkrankung nach wie vor erst post mortem neuropathologisch geliefert werden kann.

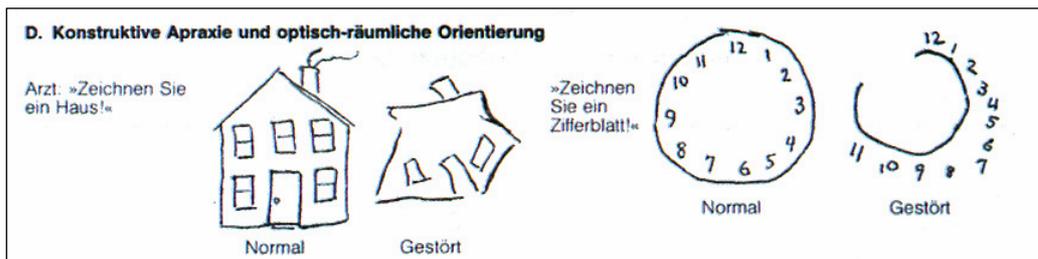


Abb.3: Test zur Beurteilung von Störungen höherer kortikaler Leistungen (aus: Möller/Laux/Deister, Psychiatrie, Hippokrates Vrlg., 1995)

Als diagnostische Instrumentarien stehen der DMS-IV (Version 1994) sowie die Kriterien der NINCDS-ADRDA-Arbeitsgruppe (McKhann et al., 1984) zur Verfügung. Als Einschlusskriterien gelten unter anderem das Vorliegen einer progressiven Demenz mit kognitiven Defiziten, die zu Einschränkungen bei der Bewältigung von beruflichen oder privaten Aktivitäten führen, der Ausschluß einer hirnganischen Störung, das Fehlen einer Bewußtseinsstörung sowie der Beginn der Erkrankung zwischen dem 40. (early-onset-Typ) und dem 90. Lebensjahr.

2.1.4. Pathogenese und Äthiologie

Obwohl die Entstehung der AD noch immer als multifaktoriell angesehen wird (Hardy et al., 1997), rücken zum einen diejenigen Veränderungen, die ihr pathomorphologisches Korrelat in den senilen Plaques und Neurofibrillen (Neurofibrillary Tangles - NFT) haben, zum anderen die intrazerebralen Oxidationsvorgänge in den Vordergrund (Markesbery et al., 1997, Multhaup et al., 1997).

Die senilen Plaques, ubiquitär im Gehirn, vor allem aber in der Hirnrinde (Limbischer- und Assoziationskortex) vorkommende extrazelluläre Ablage-

rungen, bestehen aus Amyloid β ($A\beta$), einem durch Abspaltung aus seinem Vorläuferprotein Amyloid-Precursor-Protein (APP) hervorgehendem Polypeptid. $A\beta$ hat eine Länge von 39-43 Aminosäuren, es kommt in Form von Amyloid-Fibrillen (7-10 nm) und als Einzelfragment innerhalb der Plaques vor (Selkoe, 1999). Auch intravaskulär können Amyloidablagerungen mittels Kongorotfärbung nachgewiesen werden, diese Veränderung wird als kongophile Angiopathie bezeichnet (Müller-Hill et Beyreuther, 1989).

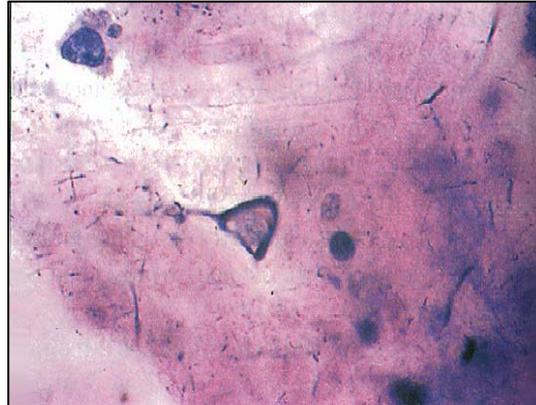


Abb. 4: Alzheimer Fibrille, Braunnüßfärbung (aus: C.Thomas, Histopathologie, Schattauer Vrlg., 13.Aufl.,

Die *physiologische* Funktion des $A\beta$ ist noch nicht geklärt; da in den

Projektionsfeldern der senilen Plaques jedoch die für die AD typischen neurodegenerativen Bezirke liegen, kann von einer *pathogenen* Funktion ausgegangen werden (Sandbrink et Beyreuther, 1997).

Das Absterben der Neurone ist wahrscheinlich nicht Folge einer direkten Neurotoxizität des Amyloids, sondern resultiert aus der Nervenschädigung durch freie Radikale, die vom $A\beta$ gebildet werden (Mark et al., 1996, Hensley et al., 1996).

Die $A\beta$ induzierte Membranlipid-Oxidation von Neuronen bewirkt eine selektive Störung von Ionen-Pumpen (ATPase), welches eine Depolarisation der Membran, einen vermehrten Ca^{2+} Einstrom und damit letztlich eine Dekompensation der elektrophysiologischen zellulären Homöostase sowie eine Entstehung von zytotoxischen Substanzen (Peroxinitrit) zur Folge hat (Mark et al., 1996).

Bekanntermaßen ist das Gehirn mit seinem großen Sauerstoffbedarf und -verbrauch besonders anfällig für oxidativen Streß. Hinzu kommt der hohe intracerebrale Anteil von leicht oxidierbaren Lipiden und Metallionen bei neurologisch gesunden Menschen (Spector, 1977; Bush, 2000).

In Gehirnen von Alzheimer Patienten hat sich zusätzlich eine erhöhte Konzentration von Produkten der Lipidperoxidation (Sayre et al., 1997)

sowie ein deutlich erniedrigter Spiegel von Ascorbat gezeigt (Schippling et al., 2000).

Diese Erkenntnisse führten zu der Überlegung, Alzheimer Patienten mit Antioxidantien in Form von Vitamin E zu supplementieren, und so die Neuronen schädigende Oxidation zu reduzieren (Sano et al., 1997).

Das zweite morphologische Charakteristikum der AD, die neurofibrillären Bündel, bestehen hauptsächlich aus pathologisch verändertem tau-Protein, einem strukturellen Protein, welches wahrscheinlich für die Stabilisierung des Zellgerüsts, der Mikrotubuli, zuständig ist (Mandelkow, 1997). Bei der AD liegt es nicht in gelöster, sondern in hochgradig phosphorylierter unlöslicher Form vor. Es stellt allerdings keinen Alzheimer spezifischen Marker dar, vielmehr gilt die Hypothese, daß das pathologische tau-Protein von untergehenden Neuronen freigegeben wird und somit ein gemeinsames Merkmal neurologischer Erkrankungen wie z.B. der vaskulären Demenz, der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung oder der Meningoenzephalitis darstellen könnte (Selkoe et al., 1982).

Einen Zusammenhang zwischen dem pathologischen tau-Protein und den bei Alzheimerpatienten vermehrt vorkommenden Advanced Glycation Endproducts (AGEs) sieht Smith et al., 1995. Die AGEs, die zu einer oxidativen Glykolisierung von Membranproteinen und Lipiden führen, bewirken die Umwandlung des normalen löslichen Taus in das pathologische unlösliche.

Somit stehen die beiden morphologischen Hauptmerkmale der AD in engem kausalem Zusammenhang zu oxidativen Vorgängen.

Dieselben pathogenetischen Vorgänge laufen auch bei der genetisch determinierten Form des M.Alzheimer, die sich in Form der early-onset-AD manifestiert, ab. Von dieser familiären Variante, die sich durch Mutation dreier Gene auf verschiedenen Chromosomen charakterisieren läßt, sind nur etwa 5-10 % der Patienten betroffen, allen gemeinsam ist ein vermehrtes Auftreten von A β (Selkoe, 1997). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit der von der Mutation betroffenen Menschen liegt bei ca. 50 %.

Durch die Mutation des für β APP (Amyloid-Precursor-Protein) codierenden Gens auf Chromosom 21 wird durch Abspaltung von der veränderten

APP-Variante vermehrt das etwas längere βA_{42} gebildet, welches eine höhere Potenz zur Plaquebildung besitzt (Citron et al., 1992).

Die gleichen Auswirkungen haben Mutationen der Gene Presenilin 1 auf Chromosom 14 und Presenilin 2 auf Chromosom 1.

Als Risikofaktor sowohl für die sporadische late-onset Form, als auch für die familiäre early-onset Form gilt das Vorhandensein des ApoE (Apolipoprotein E) Allels ϵ_4 , welches einhergeht mit einer Zunahme der Dichte der Amyloidplaques (Selkoe, 1997).

2.2. Oxidationsvorgänge in vivo

2.2.1. Oxidation und freie Radikale

Die ersten Überlegungen zum chemischen Vorgang der Oxidation stellte vor ungefähr 200 Jahren Lavoisier an. Er stellte fest, daß bei der Verbrennung von Stoffen an der Luft Sauerstoff (Oxygenium) verbraucht wird und die Stoffe dadurch ihre chemischen Eigenschaften verändern.

Im menschlichen Körper finden ubiquitär Oxidationsvorgänge statt, die nicht zwingend zu einem Verbrauch von O_2 führen, aber in denen die beteiligten Substanzen (Lipide, Proteine, etc.) ihre Struktur und Eigenschaft verändern.

Diejenigen Stoffe, die oxidiert werden, geben Elektronen ab, die Stoffe, die die Oxidation bewirken, nehmen Elektronen auf und werden damit reduziert.

Im Körper gibt es Moleküle, die mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen (Halliwell et al., 1989) und damit besonders reaktiv sind – die freien Radikale. Sie können andere Substanzen besonders leicht oxidieren. Auch der molekulare Sauerstoff, der im Ruhezustand kaum oxidativ wirkt, kann durch externe Einwirkungen, wie z.B. UV-Strahlung oder Reaktion mit Metallionen, in das sehr reaktive Hydroxylradikal übergehen.

Die freien Radikale lösen kaskadenartige Oxidationsvorgänge aus, die nur durch Reaktion der Radikale miteinander oder die Wirkung eines Antioxidans gestoppt werden können.

Die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Lipoproteinen bewirkt degenerative Prozesse, wie z.B. Gefäßsklerose (Esterbauer et al., 1992) oder neurodegenerative Prozesse, weshalb ein therapeutischer Ansatz mit Antioxidantien in der Behandlung des M. Alzheimer sinnvoll zu sein scheint.

2.2.2. Lipoproteine

Lipoproteine haben im Körper die Funktion des Transportes von Lipiden und anderen lipophilen Substanzen im wässrigen Milieu des Blutes. Sie bestehen aus einer hydrophilen Hülle aus Proteinen, Phospholipiden und Cholesterin und einem lipophilen Kern aus Cholesterinestern und Triglyceriden. Außerdem enthalten die Lipoproteine Antioxidantien – im Kern z.B. Ubichinol-10, in der Hülle vor allem α -Tocopherol.

Die in der Hülle lokalisierten Proteine, die sogenannten Apolipoproteine, sind zuständig für die rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzelle. Zu ihnen zählt auch das in Leber und Gehirn synthetisierte Apo E, dessen Allel $\epsilon 4$ einen Risikofaktor für die Entstehung der AD darstellt (s.o.).

Die Phospholipide sind ein Bestandteil von Zellmembranen, aus Cholesterin werden Gallensäuren, Steroidhormone und vor allen Dingen auch Zellmembranen synthetisiert. Triglyzeride sind die Hauptenergielieferanten und bilden die Grundlage für die Bildung weiterer Lipide.

Die Lipoproteine werden in verschiedene Klassen abhängig von ihrer Dichte eingeteilt. Nach aufsteigender Dichte unterteilt man sie in Chylomikronen, Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), Intermediate-Density-Lipoproteine (IDL), Low-Density-Lipoproteine (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL).

Abhängig von ihrer Klassifikation haben die Lipoproteine ein unterschiedliches Potential zur Atherogenität, d.h. zur Bildung von Atheroskleroseplaques an den Gefäßwänden, wobei das LDL, welches 70% des Plasmacholesterins transportiert, die höchste atherogene Potenz besitzt. Als protektiver Faktor hingegen gilt eine hohe Konzentration an HDL. In zahlreichen Untersuchungen (z.B. Steinberg et al., 1989) konnte gezeigt werden, daß vor allem die Lipidperoxidation, die sowohl im Plasma als auch im

CSF abläuft, eine Rolle bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques spielt.

2.2.3. Lipidperoxidation

Als Lipidperoxidation bezeichnet man die oxidative Umwandlung der in Lipoproteinen enthaltenen Fettsäuren zunächst in sogenannte konjugierte Diene, in einem weiteren Reaktionsschritt in Lipid-Peroxiradikale. Besonders anfällig für die oxidative Umwandlung durch freie Radikale sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs = poly unsaturated fatty acids) mit ihrem hohen Anteil an Doppelbindungen, da am zwischen zwei Doppelbindungen liegenden C-Atom eine Instabilität entsteht, die die Abspaltung des H-Atoms durch ein Hydroxyperoxidradikal erleichtert.

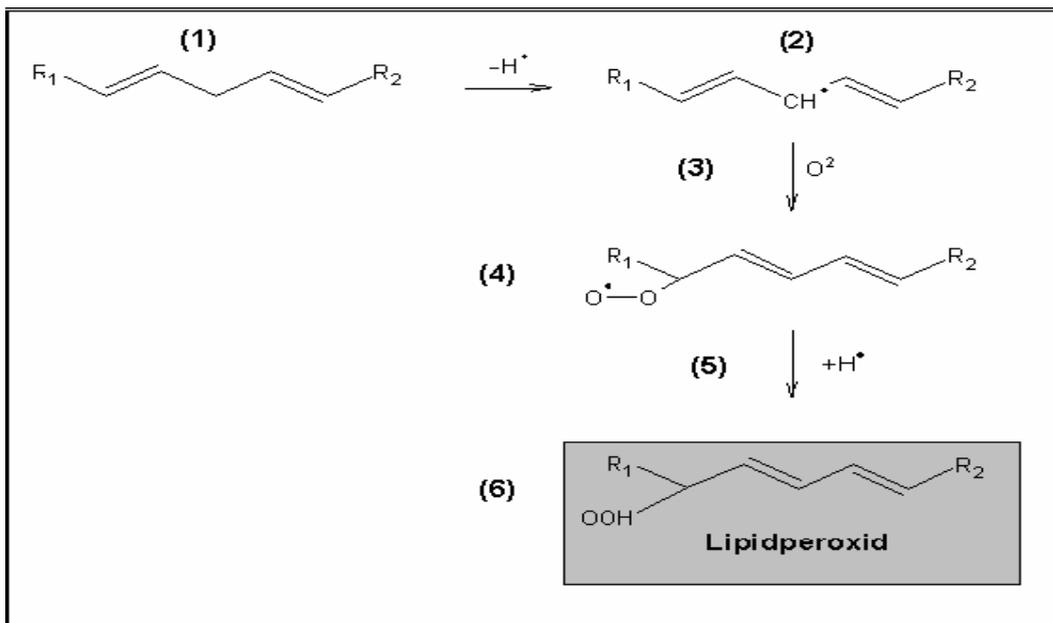


Abb. 5: Mechanismus der Lipidperoxidation (nach Gutteridge, 1995)

(1) PUFA, (2) Lipidradikal, (3) Reaktion mit Sauerstoff, (4) Peroxylradikal, (5) Kettenreaktion (6) Lipidperoxid

Die entstehenden konjugierten Diene können als Indikator für in vitro ablaufende Oxidationsvorgänge herangezogen werden, da sie sich bei einem Absorptionsmaximum von 234nm photometrisch nachweisen lassen. Die Menge der durch Oxidation entstandenen Lipid-Hydroperoxide lässt sich somit darstellen als die Änderung der Absorption der Proben bei 234nm Wellenlänge. Die Lipidperoxidation ist deshalb von so großer Be-

deutung, weil die im Folgenden durch die Reaktion mit O₂ entstehenden Lipid-Peroxidradikale (LOO·) eine Kettenreaktion mit weiteren Fettsäuren ausbilden, wodurch es wie beschrieben zu Membrandefekten, bzw. allgemein- und neurodegenerativen Prozessen kommen kann. Des Weiteren kann das entstehende Lipid-Hydroperoxid (LOOH) zu zytotoxischen Substanzen zerfallen. Die Oxidationskaskade kann beendet werden durch Reaktion der Lipid-Peroxiradikale miteinander oder mit antioxidativ wirkenden Substanzen, die unter 2.4. genauer erläutert werden.

2.3. Oxidationskinetik des Liquors

Die oxidative Modifikation der Liquor Lipoproteine, die in ihren Eigenschaften den High-Density-Lipoproteinen des Plasmas sehr ähnlich sind (Borghini et al., 1995), verläuft in drei Phasen und resultiert in der Bildung von Lipid-Hydroperoxiden in Form konjugierter Diene.

Die erste Oxidationsphase wird Lag-Phase genannt. In dieser Phase ist die Oxidationsrate annähernd Null, die endogenen Antioxidantien werden verbraucht. Sie dauert ca. 5-7 h. Die unmittelbar folgende Propagation-Phase stellt die Phase der maximalen Oxidation dar und dauert ca. 8-10 h. In der anschließenden Plateau-Phase beträgt die Oxidationsrate erneut etwa Null, d.h. die Oxidationsvorgänge sind abgeschlossen.

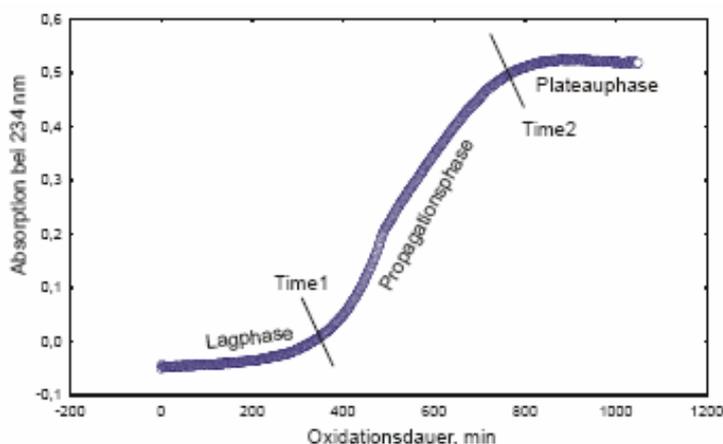


Abb. 6: Schematischer Verlauf der Liquoroxidation, Absorptionsänderung bei 234 nm (aus K. Semmler, Diss. 2003, Universität Hamburg)

Die Oxidationskinetik des Liquors verläuft sehr ähnlich der des gesamten Plasmas (Kontush und Beisiegel, 1999), wie auch der Kinetik der Plasma Lipoproteine (Esterbauer et al., 1989).

2.4. Antioxidantien

Antioxidantien sind niedermolekulare Substanzen, die in sämtlichen liquiden Kompartimenten des Körpers, sowie in geringerem Maße auch intrazellulär vorkommen und durch ihre Eigenschaft, mit freien Radikalen zu reagieren und durch diese oxidiert zu werden, protektiv auf labile Membranbestandteile wie z.B. ungesättigte Fettsäuren wirken.

Entscheidend für die Durchführung dieser Arbeit ist die Tatsache, dass einige Antioxidantien substituiert werden können, so daß ihre Wirkungsweise sowohl in physiologischer als auch in erhöhter Konzentration untersucht werden kann, und zwar in diesem Falle speziell in Blutplasma und Liquor cerebrospinalis.

2.4.1. Hydrophile Antioxidantien

Die hydrophilen Antioxidantien befinden sich in der wässrigen Phase des Blutplasmas und des CSF.

Ascorbat

Das effektivste von ihnen ist die Ascorbinsäure (Vitamin C), die als ihr Salz Ascorbat mit 30-150 μM im Plasma (Niki, 1987) und mit ca. 200 μM im CSF vorliegt (Stocker et al., 1991). Die hohe Konzentration wird im Liquor durch aktiven Transport in den Plexus choroidei erreicht (Lönnrot et al., 1996) und ist beim M. Alzheimer deutlich erniedrigt.

Im Plasma reagiert das Ascorbat direkt mit hydrophilen Radikalen, das entstehende Ascorbyl-Radikal kann mit anderen Reduktionsmitteln zu nicht radikalischen Produkten umgewandelt werden, das entstehende dehydro-Ascorbat kann in Erythrozyten wieder zu Ascorbat regeneriert werden.

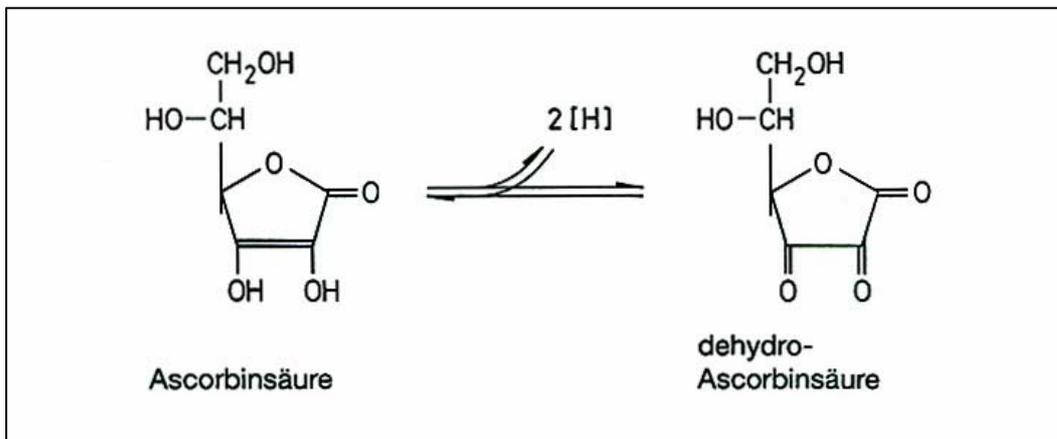


Abb. 7: Ascorbat und dehydro-Ascorbat (aus: G.Löffler, Funktionelle Biochemie Springer Vrlg., 1993)

In Lipoproteinen wirkt Ascorbat als Coantioxidans des α -Tocopherols, indem es durch Reaktion mit α -Toc-Peroxyradikalen α -Toc regeneriert (Stocker, 1994).

Die hydrophilen Ascorbylradikale können trotz des lipophilen Milieus der Lipoproteine durch Interaktion mit α -Toc antioxidativ wirken, da sie die Elektronen aus den Lipoproteinen in das wässrige Medium transportieren können.

Urat

Ein weiteres hydrophiles Antioxidans, die Harnsäure, die im Plasma in Form des Urats vorliegt, stellt das Abbauprodukt der Purine dar. Es liegt in einer Konzentration von 160-400 μ M vor (Classen et al 1993).

Auch Urat kann auf zwei unterschiedliche Weisen antioxidativ wirken:

Primär bewahrt es Membranen und Lipoproteine vor der Modifikation durch Sauerstoffradikale, indem es diese in der wässrigen Phase abfängt.

Außerdem übt es einen indirekten antioxidativen Effekt aus durch Regeneration des Ascorbats (Sevanian et al 1985), während eine Interaktion mit dem lipophilen α -Toc nicht möglich ist, wodurch sich die geringere antioxidative Potenz gegenüber Ascorbat erklären lässt (Ma et al., 1994).

Bilirubin

Bilirubin, als drittes hydrophiles Antioxidans zu nennen, liegt im Plasma in einer Konzentration von 5 - 20 μM vor (Classen et al 1993). Es stellt das Abbauprodukt des menschlichen Blutfarbstoffes Häm dar und liegt aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit im Plasma fest an Albumin gebunden vor.

Sowohl Bilirubin, als auch die Vorstufe, das Biliverdin kann als Radikalfänger fungieren und dadurch antioxidativ wirken. Bilirubin kann zwei Hydroperoxidradikale einfangen und wird dabei zu Biliverdin oxidiert, das dann rasch wieder zu Bilirubin reduziert wird. Bezogen auf molare Verhältnisse besitzt albumingebundenes Bilirubin als Schutz vor wasserlöslichen Peroxiden etwa ein Zehntel der Wirksamkeit des Ascorbats (Stryer, 1994).

Wie auch das Ascorbat kann Bilirubin zur Regeneration von α -Tocopherol-Peroylradikalen zu α -Toc beitragen und dadurch die Lipidperoxidation verlangsamen.

Sulfhydrylgruppen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem die Konzentration der Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) bestimmt. Diese, meist in Form von Albumin oder Gluthation vorliegend, spielen eine große Rolle bei der intrazellulären Antioxidation. Im Plasma liegen sie gewöhnlich in einer Konzentration von 400-600 μM vor.

2.4.2. Lipophile Antioxidantien

Die wichtigsten lipophilen Antioxidantien, deren Konzentrationen vor und nach Vitamin E Supplementierung im Plasma gemessen wurden, sind die Tocopherole, vor allem das α -Toc als Hauptform des Vitamin E, die Carotinoide und die Ubichinole.

Im Liquor hingegen konnte aufgrund der etwa 100-500-mal niedrigeren Lipidkonzentration nur α -Toc relevant detektiert werden.

α -Toc leistet als Membranbestandteil einen wichtigen Beitrag zum Schutz vor Lipidperoxidation. Es reagiert in einem ersten Schritt mit einem Per-

oxylradikal zu einem α -Tocopheroxylradikal und einem Hydroperoxid, in einer Folgereaktion entstehen durch Anlagerung eines Peroxylradikals an ein α -Tocopheroxylradikal nicht-radikalische Produkte, oder aber es wird durch weitere Antioxidantien, vor allem das hydrophile Ascorbat, wieder regeneriert.

In hoher Konzentration vorliegend kann α -Toc allerdings auch prooxidativ wirken (Bowry and Stocker, 1993), weshalb in dieser Studie die Gabe von 400 mg gegenüber den von Sano et al. 1997 verabreichten 2000mg vorgezogen wird.

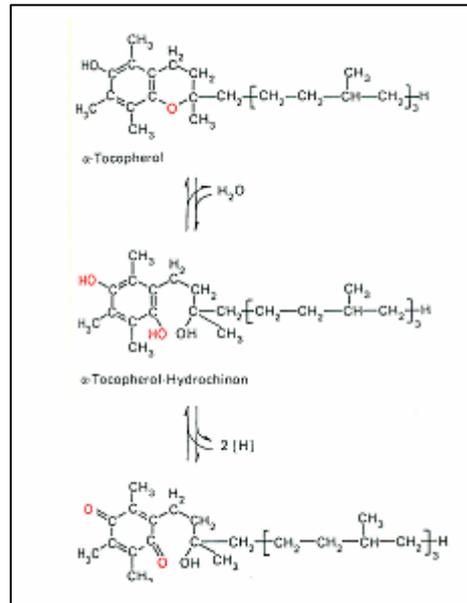


Abb.8: α -Tocopherol als Redoxsystem (aus: G.Löffler, Biochemie, Springer Vrlg., 1993)

Carotinoide

Zu den Carotinoiden gehören unter anderem α -Carotin und β -Carotin. Letzteres wird auch Provitamin A genannt, da durch Spaltung der zentralen Doppelbindung zwei Moleküle Vitamin A entstehen. Die antioxidative Wirkung beruht auf der Bildung eines stabilen β -Carotinylnradikals durch Abfangen von freien Radikalen, welches im relativ sauerstoffarmen Milieu des Blutplasmas zum Tragen kommt (Burton et al., 1988).

Ubichinole

Ubichinole kommen im menschlichen Organismus in Form des Ubichinol-10 in allen Zellmembranen und im Plasma vor. Sie gehen Redoxverbindungen ein, dabei wird Ubichinol-10 zu Ubichinon-10 oxidiert, welches ebenfalls eine antioxidative Wirkung hat, allerdings in erst in deutlich höheren Konzentrationen als den physiologischen in Plasma und CSF (Kon-tush et al., 1995a).

Die auch in niedrigen Konzentrationen sehr effektive antioxidative Wirkung des Ubichinol-10 kommt nicht so sehr durch die direkte Interferenz mit

freien Radikalen zustande, im Sinne der von α -Toc bekannten Kettenreaktion, sondern durch seine Funktion als Co-Antioxidans von α -Toc.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

HPLC – System:

LKB 2249 HPLC Pump (LKB-Producter AB, Bromma, Schweden)

LKB 2156 Solvent Conditioner (LKB-Producter AB, Bromma, Schweden)

Elektrochemischer Detektor Coulochem II (Enviromental Sciences Association, Bedford, USA)

Analytical Cell Modell 5011 (Enviromental Sciences Assoc., Bedford, USA)

Conditioning Cell Modell 5020 (Enviromental Sciences Assoc., Bedford, USA)

HPLC-Säule LiChroCart 125-4, LiChrospher 100 RP-18,5 μ m Partikelgrösse (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Gaschromatographisches System:

Gaschromatograph Hewlett-Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard Palo Alto, USA)

Massenspektrometer 5972 Series (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)

Gaschromatographische Säule HP-5MS, 30m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 μ m Filmdicke

Laborzentrifuge Biofuge fresco (Haereus, Deutschland)

Laborzentrifuge Labofuge Haereus Christ (Haereus, Deutschland)

Spektralphotometer UV2 (ATI Unicam, Grossbritannien) mit Küvettenwechsler für 8 Küvetten

Quarzglasküvetten, Volumen 700 μ l (Hellma, Deutschland)

Spektralphotometer Modell 150-20 (Hitachi, Japan)

3.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chelex 100 resin, 50-100 mesh (Bio-Rad, München, Deutschland)

Natriummetoxid (Alltech, Unterhaching, Deutschland)

Lipoxygenase aus Sojabohnen und A β -Peptid 1-40 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoylsäure)) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)

BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid) Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Granulst[®] 25 Plus (Merck, Deutschland)

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel sind von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen worden.

3.3. Gewinnung und Vorbereitung des Probenmaterials

Blutproben und Liquor cerebrospinalis wurden 10 an der Alzheimer Demenz leidenden Patienten zu jeweils zwei Zeitpunkten parallel entnommen. 1 ml Liquor wurde durch Lumbalpunktion zwischen L3 und L4 gewonnen, 10 ml EDTA Blut durch periphere Venenpunktion der Vena cubitalis. Die Proben wurden unmittelbar nach der Gewinnung mit Argon begast und bei -80°C eingefroren, um einer unkontrollierten Oxidation vorzubeugen. Zusätzlich wurden die für die Ascorbinsäurebestimmung vorgesehenen Plasma- und Liquorproben nach der Gewinnung mit 10%iger meta-Phosphorsäure im Verhältnis 1:1 gemischt und 3 min. bei 4°C und 13.000rpm zentrifugiert (Biofuge fresco) um einen enzymatischen Abbau der Ascorbinsäure zu verhindern.

Die Proben wurden nicht länger als drei Monate gelagert und die einzelnen Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

3.4. Das Patientenkollektiv

Die an der Studie teilnehmenden Patienten wurden aus der Gedächtnisprechstunde der Psychiatrischen Klinik des Universitätskrankenhauses

Eppendorf, Hamburg rekrutiert, nach ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf und schriftliche Einverständniserklärung. Ein Ethikvotum der Ethikkommission Hamburg liegt vor.

Vier der Probanden waren weiblich, sechs männlich. Die Altersverteilung erstreckte sich von 55 bis 76 Jahren, der Schweregrad der Erkrankung, dargestellt durch die sogenannte Severity, reichte von 1 (leichte dementielle Symptomatik) bis 3 (mittelschwere dementielle Symptomatik). Befragt hinsichtlich ihrer Lebensgewohnheiten gaben zwei der Patienten an, zum Studienzeitpunkt zu rauchen, vier tranken gelegentlich Alkohol. Ebenfalls erfasst wurden internistische Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertonus und andere kardiovaskuläre Erkrankungen. Alle Patienten lebten zu hause und waren mobil und in einem guten Ernährungszustand (BMI von 25kg/m²) mit normalen Blutfettwerten.

Patient Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Geschlecht	m	m	w	w	m	m	w	w	m	m
Alter	60	76	72	68	75	55	59	68	56	56
Severity	3	3	1	1	1	1	1	2	1	2
Nikotin	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein
Alkohol	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja
Hypertonus	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja

Tab. 1: Charakteristika des Kollektivs

Die erste Probenentnahme erfolgte unmittelbar zu Beginn der Studie, die zweite jeweils nach einer genau vierwöchigen Supplementierung mit 400 mg Vitamin E (La Roche, Schweiz) täglich. Die Einnahme erfolgte als einmalige Dosis am Morgen.

3.5. Messung der oxidativen Parameter im Plasma

Jede Probe wurde in einem Doppelansatz bestimmt, um den Messfehler möglichst klein zu halten. Der Messwert ermittelt sich aus dem Mittelwert.

3.5.1. Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien

3.5.1.1. Bestimmung der Ascorbinsäure Konzentration

Prinzip: Ascorbinsäure reduziert den Farbstoff DCIP (2,6-Dichlorphenolindophenol) und bewirkt dadurch eine Abnahme der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Zunächst werden 400 µl des bereits nach der initialen Probengewinnung mit 10%iger meta-Phosphorsäure versetzten Plasmas (sh. 3.3) mit 200 µl eines Citrat-Acetat-Puffers in Reagenzgläsern gemischt. Für die Herstellung des Puffers werden 22 g Trinatriumcitratdihydrat in 40 ml Wasser gelöst, der pH wird mit Eisessig auf 4,15 titriert und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt. Direkt vor dem Einbringen der Lösung in das Photometer werden 200µl DCIP zugegeben und das Röhrchen gemischt, nach genau 30 sec. erfolgt die Messung der Extinktion bei 520 nm. Nun gibt man wenige Ascorbatkristalle hinzu, mischt durch leichtes Schütteln und mißt bei eingetretener Entfärbung der Lösung nochmals die Extinktion bei gleicher Wellenlänge, wodurch man den Probenleerwert erhält.

Zur Erstellung einer Eichkurve werden Standards einer definierten Vitamin C Lösung in absteigender Konzentration hergestellt. Dafür werden 200mg Ascorbat mit einer 5%igen m-Phosphorsäure auf 10ml aufgefüllt, 200µl dieser Lösung werden mit 5%iger m-Phosphorsäure auf 2000µl aufgefüllt, dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt, so daß nun eine Eichlösung mit einer Konzentration von 20 µg/ ml vorliegt. Von dieser Eichlösung wird eine Verdünnungsreihe in fünf 1:1 Schritten angefertigt, indem 1 ml Lösung mit 1 ml 5%iger m-Phosphorsäure versetzt werden. Abschließend erhält man Konzentrationen von 20 µg/ ml, 10 µg/ ml, 5 µg/ ml, 2,5 µg/ ml und 1,25 µg/ ml, von denen jeweils 400µl verwendet werden.

Als Reagenzienblindwert dient ein Doppelansatz von 400 µl einer 5%igen m-Phosphorsäure. Sowohl Standards als auch Blindwerte werden wie die Proben mit Citratpuffer und DCIP gemischt und die Absorption bei 520 nm gemessen.

Zur Berechnung der Extinktion dient folgende Formel:

$$\text{Extinktion}_{520} = (\text{RB} - \text{RBb}) - (\text{S} - \text{Sb})$$

RB = Reagenzienblindwert vor Reduktion

RBb = Reagenzienblindwert nach Reduktion

S = Absorption der Probe vor Reduktion

Sb = Absorption der Probe nach Reduktion

Für Proben und Standards werden gleichermaßen die Extinktionswerte berechnet, anhand der Standardwerte kann dann die Eichkurve erstellt werden, mit deren Hilfe schließlich die Ascorbatkonzentration im Plasma bestimmt wird.

3.5.1.2. Bestimmung der Urat Konzentration

Zur Messung der Urat Konzentration im Plasma wird der Granutest® 25Plus (Merck, Deutschland) verwendet und gemäß der beiliegenden Versuchsanleitung verfahren. Als Probenmaterial werden 20µl Plasma pro Messung benötigt.

3.5.1.3. Bestimmung der Sulfhydrylgruppen Konzentration

Zur photometrischen Messung der SH-Gruppen in den Proben werden jeweils 50 µl Plasma mit 50µl 0,9% NaCl, 900µl EDTA und 20µl DTNB (5,5'- Dithio- bis-2- nitrobenzoylsäure) versetzt, desgleichen werden für die Probenleerwerte 50µl Plasma mit NaCl und EDTA, aber ohne DTNB gemischt, um die individuelle Absorption des Plasmas, die nicht von der Reaktion des DTNB mit den SH- Gruppen zu 2- Nitro- 5- Mercaptoben- zoylsäure herrühren, auszuschalten. Stattdessen werden zu den Leerwertproben 20µl Phosphatpuffer 0,025M hinzu gegeben.

Beide Ansätze werden für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 412nm gegen Luft photometrisch gemessen.

Als Eichleerwert dient eine Lösung aus 900µl EDTA, 100µl NaCl und 200µl DTNB.

Die Konzentration der SH- Gruppen Errechnet sich wie folgt:

$$\text{Konzentration } c \text{ [}\mu\text{M]} = \text{Absorption} \times 1500$$

$$\text{Absorption} = \text{Abs}_{\text{Probe}} - \text{Abs}_{\text{Probenleerwert}}$$

Herstellen der Lösungen :

EDTA 2mM - 74,44 mg in 100 ml Na₂HPO₄ (pH 9,0)

Phosphatpuffer - 30,5 ml Na₂HPO₄ 0,2 M mit 19,5 ml NaH₂PO₄
(0,025 M, pH 7,0)

DTNB 10 mM - 40 mg DTNB in 10 ml Phosphatpuffer 0,025 M,
10min. mischen, filtrieren

3.5.1.4. Bestimmung der Bilirubinkonzentration

Zur photometrischen Messung der Bilirubinkonzentration wird zunächst die zu verwendende Reagenzlösung wie folgt angesetzt. 100 μ l Etylanthranilat werden in 10ml 0,15M Salzsäure suspendiert und mit 300 μ l einer 10% NaNO₂ Lösung versetzt. Diese Lösung wird 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 100 μ l einer 1% Ammoniumsulfatlösung versetzt und ist unmittelbar nach Herstellung zu verwenden.

Im Folgenden mischt man für die Probenansätze 100 μ l Plasma mit 1ml DMSO (Dimethylsulfoxid) und gibt 400 μ l der Reagenzlösung hinzu. Das Gemisch wird 10 min. bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert, der Überstand in Einwegküvetten abdekantiert und die Absorption der Probe bei Wellenlängen von 530nm und 650nm gegen den Blindwert gemessen.

Zur Herstellung des Blindwertes werden 100 μ l NaCl 0,9% mit 1ml DMSO und 400 μ l Reagenzlösung gemischt.

Für die Ermittlung der Eichwerte wird aus einer 500 μ M Bilirubin Stammlösung in DMSO eine Verdünnungsreihe erstellt. Zunächst mischt man 100 μ l der Stammlösung mit 900 μ l DMSO, aus der entstandenen 50 μ M Lösung wird eine Verdünnungsreihe im Bereich von 1,563 μ M bis 50 μ M erstellt. Jeweils 100 μ l aus der Verdünnungsreihe werden mit 900 μ l DMSO,

100µl NaCl 0,9% und 400µl Reagenzlösung versetzt und die Absorption ebenfalls bei 530nm und 650nm gemessen.

Um die Eichgerade zu erstellen, werden die Differenzen der Absorption der Standards bei den beiden gemessenen Wellenlängen gegen die Konzentration der Standards aufgetragen. Die Konzentration des Bilirubins der Plasmaproben errechnet sich aus der Differenz der Absorptionen bei 650nm und 530nm und der Regressionsgeraden der Eichkurve.

3.5.2. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien

Die im menschlichen Plasma enthaltenen lipophilen Antioxidantien α - Tocopherol, γ - Tocopherol, Ubichinol-10 und, als dessen primäres Oxidationsprodukt, Ubichinon-10, α - Carotin und β - Carotin werden mittels der reversed-phase HPLC (High-Performance Liquid-Chromatography) mit Farbdetektion bestimmt (Finkh et al., 1995).

Als interne Standards dienen δ - Tocopherol, Ubichinol-9 und Ubichinon-7, die durch Verdünnung mit Ethanol in bekannter Konzentration vorliegen.

Für den Probenansatz werden 100µl Plasma mit 500µl Hexan, 30µl Ethanol, 40µl Ubichinol-9 und 30µl Ubichinon-7 versetzt, 1 min. mittels Vortex gemischt und im Anschluß 3 min. bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert.

Das Ethanol dient der Proteinausfällung, Hexan extrahiert die Lipide.

Nun werden 400µl der Hexanphase (obere Phase) abpipettiert in ein Ependorftube und 10 min. unter Stickstoff abgedampft, der Niederschlag wird daraufhin in 1ml Ethanol durch Schütteln gelöst, 150µl dieser Lösung werden in das HPLC-System injiziert.

Bei verzögerter Messung, die aber in jedem Falle noch am selben Tag erfolgen sollte, werden die Proben erneut unter Argonbegasung bei -80°C eingefroren.

Das Laufmittel (mobile Phase) des HPLC-Systems, welches mit Helium entgast wird, setzt sich zusammen aus einer Ethanol-Methanol-2-Propanol-Lösung im Verhältnis 18 : 5 : 2 und einem Zusatz von 1,425 Lithiumperchlorat.

Die Laufgeschwindigkeit der mobilen Phase beträgt 1,3 ml/ min., die Messung erfolgt über eine C18-RP Säule mit einem Druck von ca. 8Mpa.

Die Detektion der lipophilen Antioxidantien findet in einem elektrochemischen Detektor und zwei Zellen, die nach dem Oxidations- Reduktionsmodus arbeiten, statt. Die erste, so genannte conditioning-cell (model 5020), hat ein Potential von $E = -600\text{mV}$, die zweite, die analytic-cell (model 5011), wird an der ersten Elektrode auf ein Potential von $E_1 = -150\text{mV}$, an der zweiten Elektrode auf ein Potential von $E_2 = +600\text{mV}$ eingestellt.

Die Konzentrationen der Antioxidantien errechnen sich durch Integration der graphischen Darstellung der gemessenen Volumina anhand der durch die Standards ermittelten Eichkurve.

3.5.3. Bestimmung der Fettsäurekonzentration

Die in den Plasmaproben enthaltenen Lipide werden in einem mehrschrittigen Verfahren der gaschromatographischen Bestimmung zugänglich gemacht.

Zunächst erfolgt die Extraktion der Lipide nach Folch (Folch et al., 1957).

100 μl Plasma werden mit 25 μl einer Standard Heptadecansäurelösung, 25 μl des Antioxidans BHT und 2000 μl eines Methanol : Toluol Gemisches im Verhältnis 4 : 1 versetzt und mit dem Vortexrührer 1 min. gemischt. Während des Mischvorganges werden tropfenweise 200 μl Acetylchlorid hinzu gegeben. Für die acide Methylierung wird diese Lösung 60 min. bei 80°C inkubiert und nach 5minütiger Abkühlung auf Raumtemperatur mit 5ml einer wässrigen 6%igen Natriumcarbonatlösung versetzt, mit dem Vortexrührer kurz gemischt und anschließend 10 min. mit 4000rpm zentrifugiert. Von der oberen, die Lipide enthaltenen Phase werden ca. 300 μl abgenommen, unter Stickstoff abgedampft und das Pellet in 20 μl Toluol aufgenommen. Nach kurzem Durchmischen (Vortex) werden 2 μl dieser Lösung in den Gaschromatographen injiziert zur Quantifizierung der Lipide.

Die Auftrennung der Lipide erfolgt über eine Säule von 30m Länge und einem Innendurchmesser von 0,25mm. Helium dient als mobile Phase mit

einer Flussgeschwindigkeit von 1,2ml/ min. und einem Initialdruck von 140 kPa bei einer Temperatur von 300°C.

Die Identifizierung der Lipide erfolgt in einem Massenspektrometer über eine HP-5MS-Säule gleicher Eigenschaften.

Die Berechnung der Fettsäurekonzentration wird anhand der graphischen Darstellung unter Bezug auf die Standardkurve vorgenommen.

3.5.4. Bestimmung der Gesamtlipidkonzentration

3.5.4.1. Bestimmung der Triglyceridkonzentration

Die Messung der Triglyceride wurde mit dem enzymatischen Farbttest Triglycerids-GPO-PAP® vorgenommen, die Durchführung erfolgte gemäß den Instruktionen des Herstellers.

3.5.4.2. Bestimmung der Gesamtcholesterinkonzentration

Die Messung des Cholesterins erfolgte mit dem enzymatischen Farbttest Monotest Cholesterin® (Böhringer Mannheim, Deutschland) nach vorgegebener Anweisung.

3.5.5. Bestimmung der Plasmaoxidierbarkeit

Als Maß für die Oxidierbarkeit des Plasmas wird die Akkumulation der konjugierten Diene bestimmt, die nach Zugabe von bestimmten Oxidantien im Plasma anfallen.

Pro Probe werden jeweils 2 x 20µl natives Heparinplasma mit 2950µl PBS-Puffer verdünnt. Einem dieser Ansätze werden 30µl AAPH als Oxidans hinzugefügt, dem zweiten 30µl Lipoxygenase. Ein dritter Ansatz, bestehend aus 20µl Plasma und 2980µl PBS ohne Zugabe von Oxidantien dient der Bestimmung der Autooxidation. Des Weiteren werden zur Bestimmung des Leerwertes zwei Ansätze ohne Plasma erstellt, indem jeweils 30µl AAPH und 30µl Lipoxygenase mit 2970µl PBS verdünnt werden. Die verschiedenen Ansätze werden kurz per Vortex gemischt und in die Quarzglasküvetten des Spektralphotometers pipettiert. Die Messung der Extinktion erfolgt bei einer Wellenlänge von 234nm und einer Tempe-

ratur von 37°C über einen Zeitraum von 12h, das Meßintervall beträgt 60 sec.

Die Konzentration der konjugierten Diene errechnet sich aus deren Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 29.500\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Esterbauer et al., 1989, Regnstroem et al., 1993).

3.6. Messung der oxidativen Parameter im Liquor cerebrospinalis

3.6.1. Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien

Die Konzentrationen der wichtigsten hydrophilen Antioxidantien im Liquor - Ascorbat und Urat- werden synchron mit der reversed-phase HPLC mit UV- Detektion bei einer Wellenlänge von 280nm bestimmt (Barja et al., 1994).

Für die Messung werden 300 μl des nach der Probengewinnung mit 10%iger meta-Phosphorsäure 1:1 verdünnten Liquors (sh. Kap. 3.3) mittels HPLC analysiert, als mobile Phase dient eine wässrige Lösung aus 0,1M Na_2HPO_4 , 2,5M Na_2EDTA und 2,0mM Tetrahexylammoniumchlorid (pH 3,0) mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,0ml/min.

Die Konzentration errechnet sich aus der graphischen Darstellung anhand einer Standardkurve.

3.6.2. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien

Die Konzentrationen von α - Tocopherol, γ -Tocopherol und Ubichinon- 10 werden im Liquor mit elektrochemischer Detektion der reversed-phase High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC/ECD) bestimmt (Finkh et al., 1995, Kontush et al., 1996). Für die Probenansätze werden 450 μl Liquor mit 450 μl Ethanol, 2250 μl Hexan und 50 μl Ubichinol-7 als interner Standard versetzt, 1min. mit dem Vortexgerät gemischt und 10min. bei 4°C und 4000rpm zentrifugiert. Von der oberen Hexanphase werden 2ml abgenommen und unter Stickstoff abgedampft. Der Niederschlag wird in 150 μl Ethanol aufgenommen und in einer mobilen Phase aus 13,5nM Lithiumperchlorat in Methanol, Ethanol und Iso-Propanol im Verhältnis 18:5:2 analysiert. Die Laufgeschwindigkeit beträgt 1,0 ml/min.

Die Konzentrationen errechnen sich wie oben beschrieben anhand der graphischen Darstellung.

3.6.3. Bestimmung der Fettsäuren und des Gesamtcholesterins

Die Messung der Fettsäuren und des Cholesterins im Liquor erfolgt durch die Capillary-Gas-Chromatography nach dem Prinzip der Flame-Ionisation-Detection (GC-FID) (Kontush et al., 1996). Pro Ansatz werden 100 μ l Liquor mit 2ml Chloroform zur Lipidextraktion, 100 μ l Heptadecansäure (200 μ g/ml) und 25 μ l 5- α -Cholestan (100 μ l/ml) als interne Standards und 25 μ l BHT (T-Butylhydroxytoluen) als Antioxidans versetzt und 1min. gevortext. Danach wird die Lösung 10min. bei 2500rpm zentrifugiert, um die wässrige Phase von der alkoholischen Phase zu trennen. Analog wird mit 100 μ l 0,9% NaCl als Leerwert verfahren.

Aus der unteren Chloroformphase werden 1,3ml abpipettiert und unter Stickstoff bis zur Trockne abgedampft. Das trockene Pellet wird mit 250 μ l Toluol aufgenommen. Die Methylierung der Lipide erfolgt durch Zugabe von 500 μ l Natriummethoxid und 15minütiger Inkubation bei 50°C. Nach Zugabe von 1ml 2,5% Essigsäure und 250 μ l Hexan wird die Probe 1min. gevortext und erneut 10 min. bei 2500rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und unter Stickstoff eingedampft. Dem Niederschlag werden 100 μ l DMFA und 100 μ l BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid)) hinzugefügt, die Silylierung erfolgt während einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einer letzten Eindampfung unter Stickstoff wird die Probe in 20 μ l Toluol aufgenommen, 2 μ l werden in den Gaschromatographen injiziert.

Der Identifizierung der einzelnen Lipide und des Cholesterols mittels gaschromatographischer Massenspektromie (GC/MS) folgt die Messung im GC/FID. Die Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren errechnet sich aus der Summe der Linol- und Arachidonsäurekonzentration.

3.6.4. Bestimmung der Liquoroxidierbarkeit

Die Liquoroxidierbarkeit wird durch die Konzentration der akkumulierten konjugierten Diene beschrieben, die Produkte der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren darstellen (Esterbauer et al., 1989).

Für jede Probe wird jeweils die Oxidationskinetik des Liquors unter Zugabe des Antioxidans EDTA, des Prooxidans AAPH (Cu(II),2,2'-azobis-(2-amidinpropan)Hydrochlorid) und ohne Zusatz zur Bestimmung der Autooxidation durchgeführt. Pro Probe werden jeweils 2 x 100µl Liquor mit 800µl PBS verdünnt, dem einen Ansatz werden 100µl EDTA, dem zweiten 100µl AAPH hinzugefügt. Für die Autooxidation wird ein dritter Ansatz mit 100µl Liquor in 900µl PBS ohne Zusatz erstellt. Als Leerwert dient ein Doppelansatz von 900µl PBS und 100µl AAPH. Die Lösungen werden gemischt und in verschließbare Quarzglasküvetten gefüllt, um einer Verdunstung der Proben während des 24-stündigen Meßvorganges entgegenzuwirken. Die Kinetik der Oxidation, die sich in der Menge der konjugierten Diene widerspiegelt, wird kontinuierlich über 1440 min. bei 37°C in einem Spektralphotometer mit einer Wellenlänge von 234nm gemessen. Die initiale Verdünnung des Liquors erfolgt, um den Oxidationsvorgang zu beschleunigen und die benötigte Probenmenge möglichst klein zu halten. Die Konzentration der Diene berechnet sich aus deren Extinktionskoeffizienten.

3.7. Statistische Auswertung der Daten

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm Statistica[®] (StatSoft, Inc., USA). Die Signifikanz der Meßwerte und Korrelationen wurde anhand des Wilcoxon Tests für gepaarte Stichproben ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Die Studienpopulation

Hinsichtlich der Analyse von Komorbidität und Lebensgewohnheiten gab es keine besonderen Auffälligkeiten innerhalb der Population. Zusammen-

fassend seien die unter Material und Methoden bereits dargestellten Daten hier noch einmal kurz aufgeführt.

Merkmal	Wert
Alter	64,5 ± 8,2
Geschlecht (m/w)	6/4
BMI (kg/m ²)	24,8 ± 2,5
Nikotinabusus (j/n)	2/8
Koronare Herzkrankheit (j/n)	1/9
Diabetes mellitus (j/n)	1/9
Mini Mental Status	20,3 ± 4,4
Alter bei Erkrankungsbeginn	60,0 ± 8,3
Apo E ε4 Allel Frequenz	0,40

Tab. 2 : Charakteristika des Patientenkollektivs

4.2. Die hydrophilen Antioxidantien im Plasma

Ausgewertet wurden 10 Plasmaproben bezüglich ihres Ascorbatgehaltes vor und nach Vitamin E Supplementierung. Es konnte eine signifikante Zunahme der Ascorbatkonzentration nach Supplementierung gemessen werden. Die folgende Grafik zeigt die Ascorbatkonzentration des Plasmas in μM zu den beiden Messzeitpunkten anhand einer Box-Plot Analyse.

Vor Supplementierung liegt die durchschnittliche Konzentration bei $33,01\mu\text{M}$, nach Supplementierung bei etwa $37,75\mu\text{M}$, somit liegt eine Steigerung um 14,3 % vor, das entspricht $p = 0,011$. α -Tocopherol scheint also sowohl direkt über seine eigene antioxidative Wirkung, als auch über die Erhöhung der Ascorbatkonzentration antioxidativ wirken zu können.

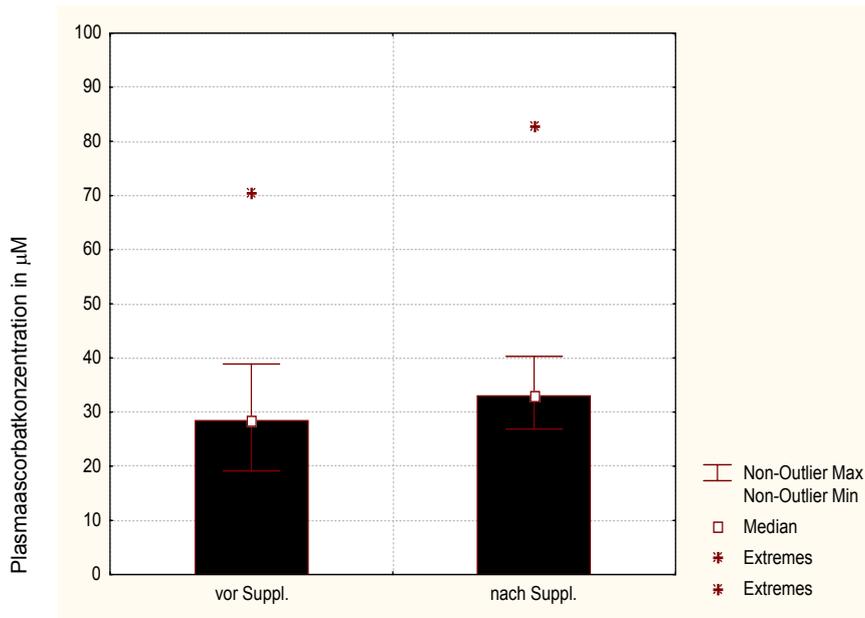


Abb. 9: Ascorbatkonzentration (μM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung

Die übrigen hydrophilen Antioxidantien, die bestimmt wurden, zeigen keine signifikante Veränderung ihrer Konzentration vor und nach Supplementierung. Dargestellt werden in folgenden Grafiken die Verläufe von Urat-, SH-Gruppen- und Bilirubinkonzentrationen jeweils in μM .

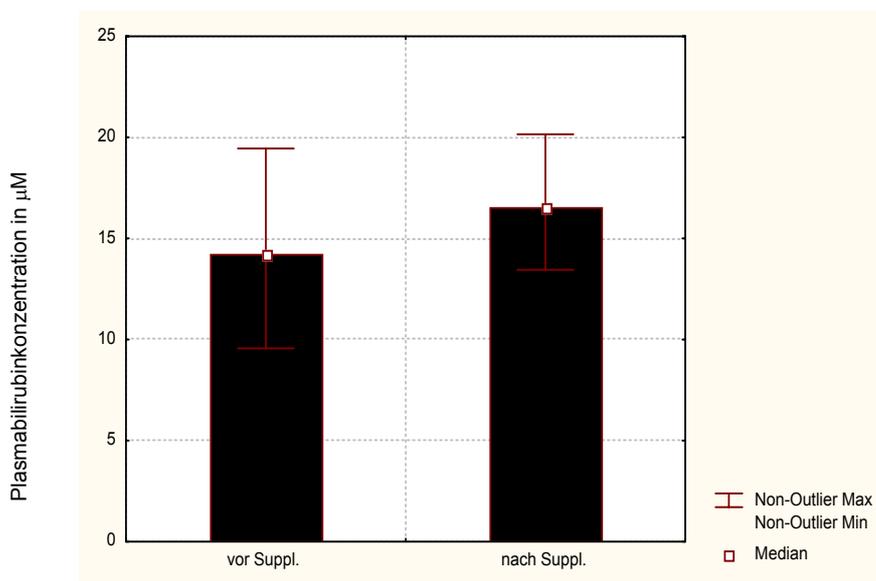


Abb. 10: Bilirubinkonzentration (μM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung

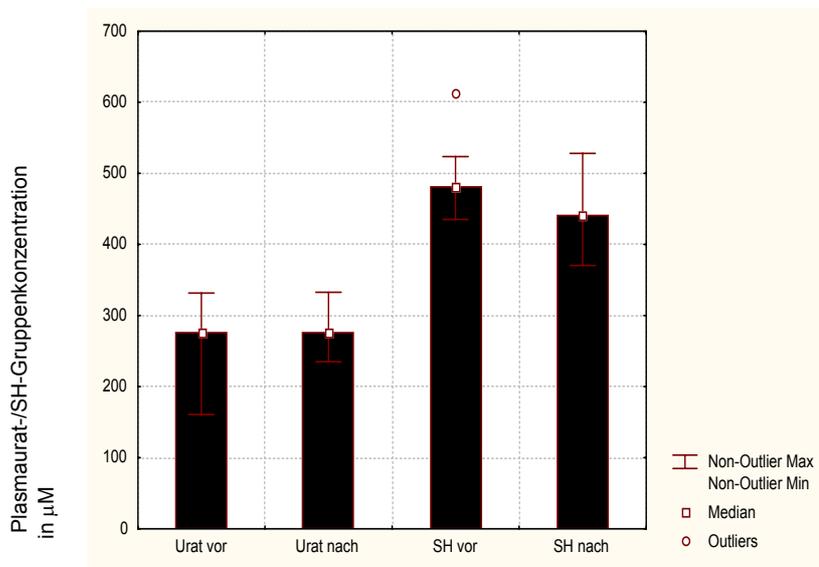


Abb. 11: Urat- und SH-Gruppenkonzentration (µM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung

Antioxidans	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. abw.	p
Ascorbat vor	19,13	70,46	33,01 ±	14,15	
Ascorbat nach	26,89	82,92	37,75 ±	16,50	0,011
SH-Gruppen vor	379,50	613,50	476,51 ±	62,06	
SH-Gruppen nach	370,50	528,00	449,04 ±	49,96	>0,05
Urat vor	160,60	331,60	264,33 ±	53,23	
Urat nach	235,10	332,70	275,16 ±	32,60	>0,05
Bilirubin vor	9,57	19,45	14,08 ±	2,82	
Bilirubin nach	9,74	20,15	15,71 ±	3,08	>0,05

Tab.3: Hydrophile Antioxidantien im Plasma vor und nach Supplementierung, Werte in µM, n=10

4.3. Die lipophilen Antioxidantien im Plasma

Interessanter ist das Verhalten der lipophilen Antioxidantien, v.a. des α -Tocopherols. Der α -Tocopherolgehalt ist nach Supplementierung erhöht, und zwar um 44,6%, so daß festzustellen ist, daß sich eine orale Substitution mit Vitamin E in objektivierbaren Meßparametern zumindest im Plasma darstellen lässt. Ob auch im Liquor, dem eigentlichen Zielkompartiment dieser Untersuchung, verifizierbare Mengen des α -Tocopherols zu finden sind, wird an späterer Stelle aufgezeigt.

Die durchschnittliche α -Tocopherolkonzentration im Plasma vor Supplementierung liegt bei 22,79 μ M, nach Supplementierung bei 32,96 μ M, $p=0,014$.

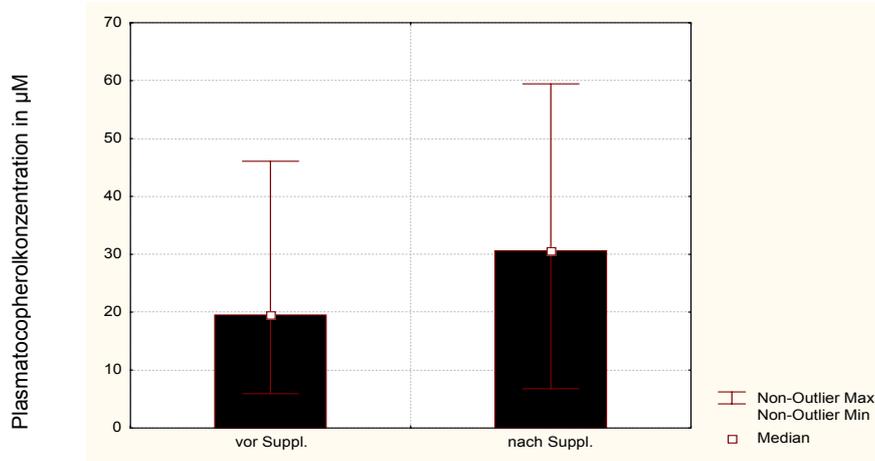


Abb.12 : α -Tocopherolkonzentration (μ M) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung

Hinsichtlich der Konzentration von Ubichinol-10 und α -Carotin ergab sich keine signifikante Änderung im Zusammenhang mit der Supplementierung, lediglich β -Carotin zeigte einen grenzwertig signifikanten Konzentrationsabfall.

Antioxidans	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. abw.	p
α -Toc vor	5,92	46,07	22,79 \pm	13,77	
α -Toc nach	6,78	59,46	32,96 \pm	19,75	0,014
α -Carotin vor	0,06	0,25	0,13 \pm	0,06	
α -Carotin nach	0,06	0,26	0,12 \pm	0,07	>0,05
β -Carotin vor	0,04	0,83	0,39 \pm	0,26	
β -Carotin nach	0,03	0,52	0,31 \pm	0,17	>0,05
Ubichinol-10 vor	0,43	1,56	0,83 \pm	0,39	
Ubichinol-10 nach	0,42	1,33	0,87 \pm	0,33	>0,05

Tab.4: Lipophile Antioxidantien im Plasma vor und nach Supplementierung, Werte in μ M, n=10

4.4. Die Plasma Lipide

Die Analyse des Gesamtcholesterol- und des Triglyceridspiegels, sowie der Fettsäuren im Plasma zeigte keinen hinweisenden Unterschied vor und nach Vitamin E Gabe. Auch wenn hinsichtlich der prozentualen Anteile der Fettsäureuntergruppen am Gesamtlipidgehalt differenziert wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede verifiziert werden. Die folgende Tabelle zeigt die Lipidanalytik des Kollektivs im Detail. Gemessen wurden neben Gesamtcholesterol und Triglyceriden auch die Gesamtmenge der Fettsäuren (TFA = total fatty acids) und der prozentuale Anteil von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA = polyunsaturated fatty acids), einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA = monounsaturated fatty acids) und gesättigten Fettsäuren (SFA = saturated fatty acids).

Plasmalipide	vor Supplementierung	nach Supplementierung
Cholesterol (mg/dl)	220 ± 51	222 ± 57
Triglyceride (mg/dl)	150 ± 63	154 ± 86
TFA (mg/dl)	651 ± 368	677 ± 366
PUFA, %	40,0 ± 5,9	39,5 ± 3,9
MUFA, %	25,8 ± 3,3	26,7 ± 2,9
SFA, %	34,2 ± 3,0	33,7 ± 2,1
ApoE (mg/l)	106 ± 36	108 ± 49

Tab. 5 : Plasmalipide vor und nach Vitamin E Supplementierung in mg/dl, bzw. %, n=10

4.5. Die Plasmaoxidierbarkeit

Zunächst ist festzustellen, daß die Oxidationskinetik sich in dieser Arbeit nicht von der bereits in anderen Untersuchungen (Schippling et al., 2000) gemessenen Kinetik unterscheidet. Im Vergleich zu gesunden Kontrollkollektiven ist die durchschnittliche Oxidationsrate bei Alzheimer Patienten – wie auch in diesem Kollektiv- deutlich erhöht (Kontush et al., 1999). Obwohl α - Tocopherol als wirkungsvolles Antioxidans bekannt ist (Sano et al., 1997) hat es in vitro scheinbar keinen Einfluß auf die Oxidationsrate

des Plasmas. Es findet allenfalls eine sehr diskrete, nicht signifikante Senkung der Oxidationsrate statt.

Im Folgenden dargestellt ist die Rate der Autooxidation des Plasmas, die anhand der Menge der entstandenen Diene in nM/min gemessen wird.

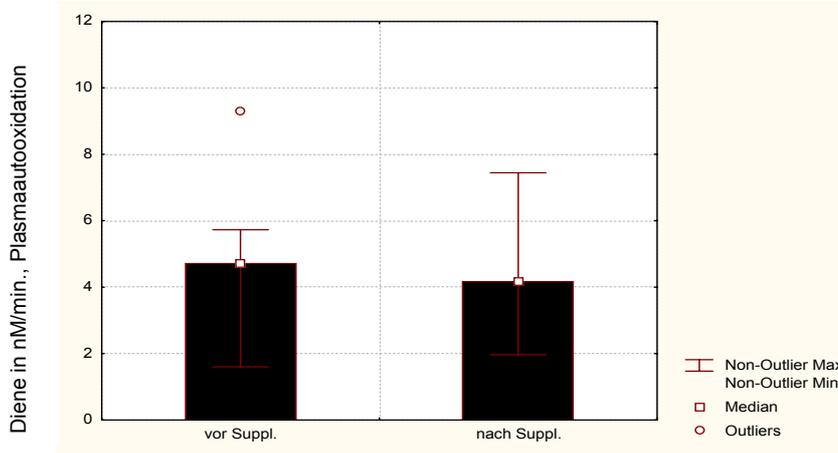


Abb.13 : Autooxidation des Plasmas vor und nach Vitamin E Supplementierung

Unter Zugabe von AAPH als Oxidans ist eine diskrete, aber ebenfalls nicht signifikante Zunahme der Oxidationsrate nach Vitamin E Supplementierung festzustellen, offensichtlich kann α -Tocopherol allein nicht der oxidativen Wirkung von AAPH entgegen wirken (sh. Abb. 14).

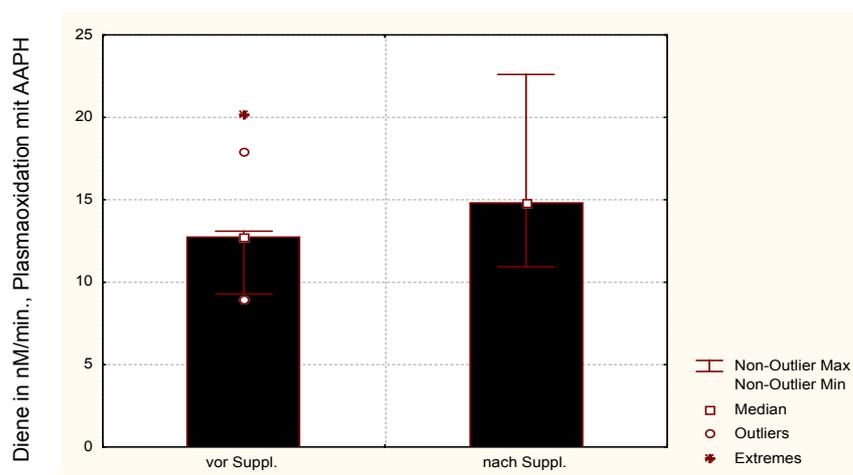


Abb. 14 : Plasmaoxidation mit AAPH vor und nach Vitamin E Supplementierung

Gleiches gilt für die Plasmaoxidierbarkeit unter Zugabe von Lipoxygenase als Oxidans.

Zusammenfassend lässt sich also bezüglich der Analyse der Oxidationsparameter des Plasmas feststellen, daß eine signifikante Beeinflussung einzig des α - Tocopherolspiegels und der Ascorbatkonzentration stattfindet.

Erklärungen hierfür und mögliche Beeinflussungen werden im Diskussteil der Arbeit erläutert. Anzunehmen ist jedoch, daß eine alleinige orale Vitamin E Supplementierung zumindest im Kompartiment Plasma keine signifikante therapeutische Relevanz besitzt.

Die Ergebnisse der Analyse der Oxidationsparameter des Liquor cerebrospinalis werden im Folgenden dargestellt.

4.6. Die hydrophilen Antioxidantien im Liquor cerebrospinalis

Die hydrophilen Antioxidantien des Liquors, Urat und Ascorbat, die synchron mit der HPLC mit UV-Detektion (Barja et al., 1994) bestimmt wurden, zeigen keine statistisch signifikante Veränderung ihrer Konzentration in Abhängigkeit von der Vitamin E Supplementierung. Die Ascorbatkonzentration zeigt einen Abfall um 11% nach Vitamin E Gabe, $p > 0,05$, Urat zeigt einen sehr diskreten, jedoch nicht signifikanten Anstieg.

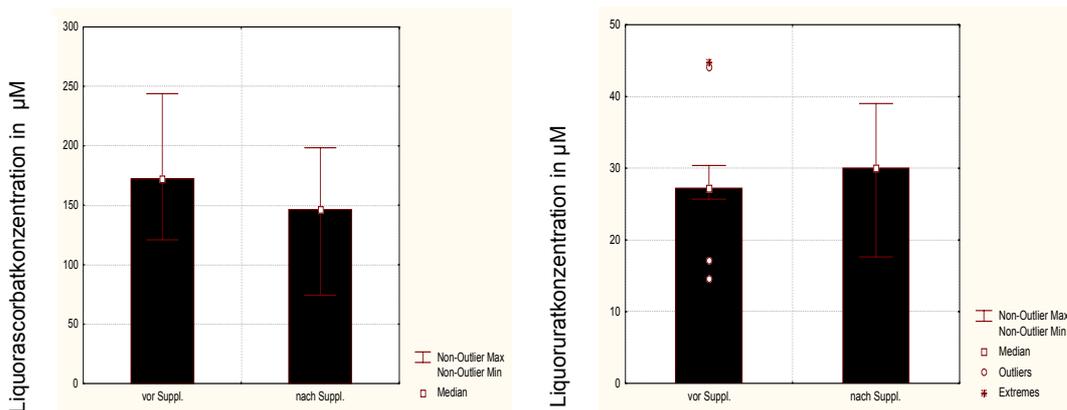


Abb. 15 und 16 : Ascorbat- und Uratkonzentration (µM) im Liquor vor und nach Vitamin E Supplementierung

Antioxidans	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std. abw.	P
Ascorbat vor	92,85	243,94	173,38	50,97	
Ascorbat nach	74,30	198,42	153,85	38,87	>0,05
Urat vor	14,60	44,77	28,76	10,27	
Urat nach	17,63	39,02	28,44	8,19	>0,05

Tab.6: hydrophile Antioxidantien im Liquor in μM , Ascorbat n= 10, Urat n= 9

4.7. Die lipophilen Antioxidantien im Liquor cerebrospinalis

Von den lipophilen Antioxidantien, detektiert mit elektrochemischer Detektion in der HPLC (Kontush et al., 1994, Finckh et al., 1995) ließ sich lediglich α -Tocopherol detektieren und zeigte, ähnlich wie im Plasma, eine signifikante Erhöhung nach Vitamin E Supplementierung, die allerdings mit 11% etwas weniger ausgeprägt ist, als im Plasma. Die Werte vor Supplementierung liegen im Liquor im Median bei etwa 63,53nM, nach Supplementierung bei etwa 70,91nM, $p= 0,002$.

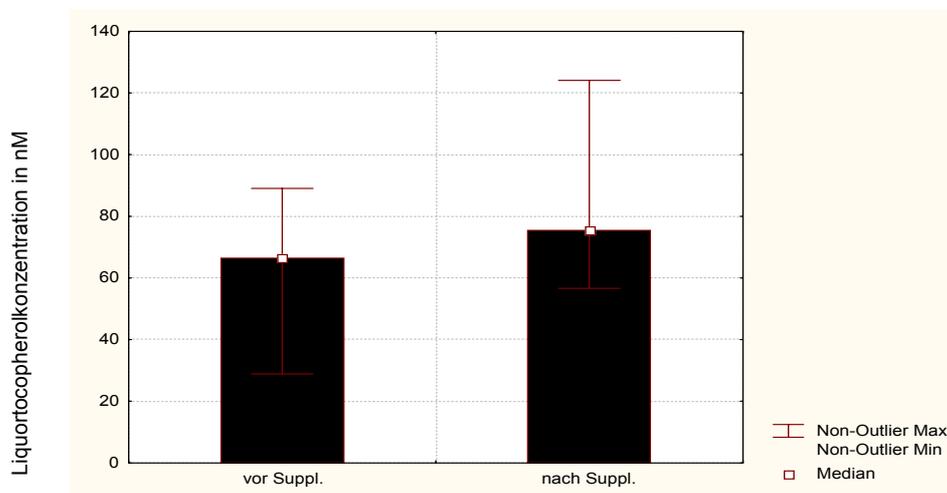


Abb. 17 : α -Tocopherolkonzentration (nM) im Liquor vor und nach Vitamin E Supplementierung

γ -Tocopherol konnte aufgrund der sehr geringen Liquorkonzentration nicht reproduzierbar detektiert werden.

Korreliert man die Konzentration von α -Tocopherol in Plasma und Liquor nach Supplementierung miteinander, zeigt sich eine signifikante negative

Korrelation, $p = 0,027$. D.h. je höher der Plasmaspiegel des α -Tocopherols nach Supplementierung, desto niedriger dessen Liquorspiegel. Dargestellt anhand einer Regressionsgeraden bei einem Konfidenzintervall von 95% auf folgender Grafik.

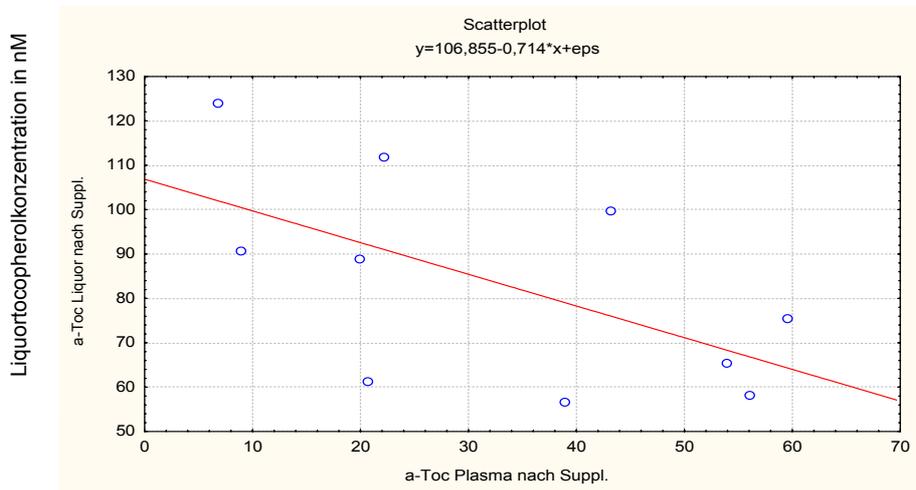


Abb. 18: Korrelation von α -Tocopherol Plasma- und Liquorkonzentration nach Vitamin E Supplementierung, Liquorkonzentration in nM, Plasmakonzentration in μM

Korreliert man hingegen die α -Tocopherolspiegel im Liquor vor und nach Supplementierung miteinander, zeigt sich eine signifikante positive Korrelation, $p = 0,002$, d.h. je höher die α -Tocopherolkonzentration vor Supplementierung, desto höher ist sie auch nach Supplementierung.

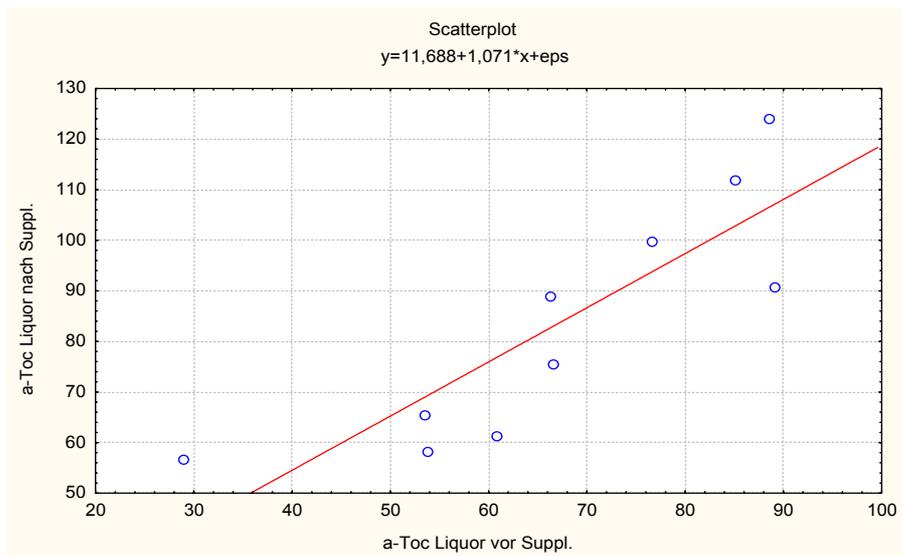


Abb. 19 : Korrelation von α -Tocopherol im Liquor vor und nach Vitamin E Supplementierung, α -Tocopherol Konzentration in nM

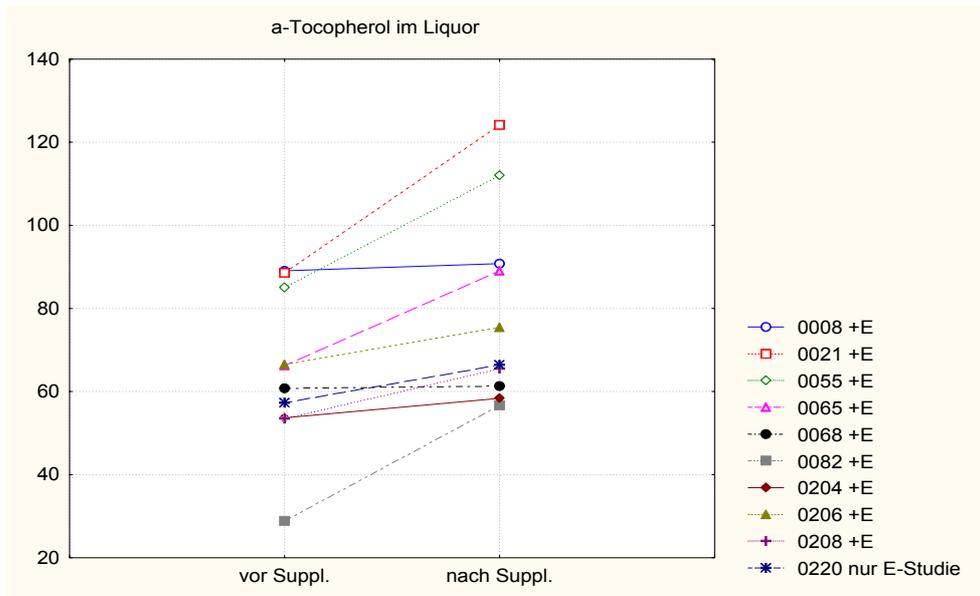


Abb. 20: α-Tocopherolkonzentration der einzelnen Liquorproben vor und nach Vitamin E Supplementierung

Bezüglich der übrigen lipophilen Antioxidantien- γ-Tocopherol, Ubichinon-10 und β-Caroten- konnten keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen gemessen werden.

4.8. Die Liquor Lipide

Die Konzentrationen der Liquorlipide, gemessen mit der Gaschromatographie (GC/FID) (Kontush et al., 1996) werden durch Vitamin E Supplementierung nicht beeinflusst. Dargestellt werden in folgender Tabelle die absoluten Cholesterol- und Fettsäurewerte sowie die prozentualen Anteile der PUFAs, MUFAs und SFAs.

Im Liquor ist die Cholesterolkonzentration etwa 40fach geringer als im Plasma, die Konzentration der Gesamtfettsäuren sogar um ein 120faches.

Liquorlipide	vor Supplementierung	nach Supplementierung
Cholesterol (mg/dl)	5,25 ± 1,40	4,29 ± 1,07
TFA (mg/dl)	5,27 ± 0,99	5,83 ± 2,60
PUFA, %	13,5 ± 6,1	11,9 ± 5,7
MUFA, %	40,8 ± 4,8	42,1 ± 5,9
SFA, %	45,6 ± 3,1	46,0 ± 4,6

Tab. 7 : Liquorlipide vor und nach Vitamin E Supplementierung in mg/dl, bzw.%, n=10

4.9. Die Liquoroxidierbarkeit

Die Oxidierbarkeit des Liquors, photometrisch gemessen (Kontush et al., 1996; Kontush et al., 1997) zeigt in dieser Studie den bekannten dreiphasischen Verlauf (Arlt et al., 2000) mit der Lag-Phase zu Beginn, der Propagation-Phase als Zeitspanne der maximalen Oxidation und der Plateau-Phase zum Abschluss des Oxidationsvorganges.

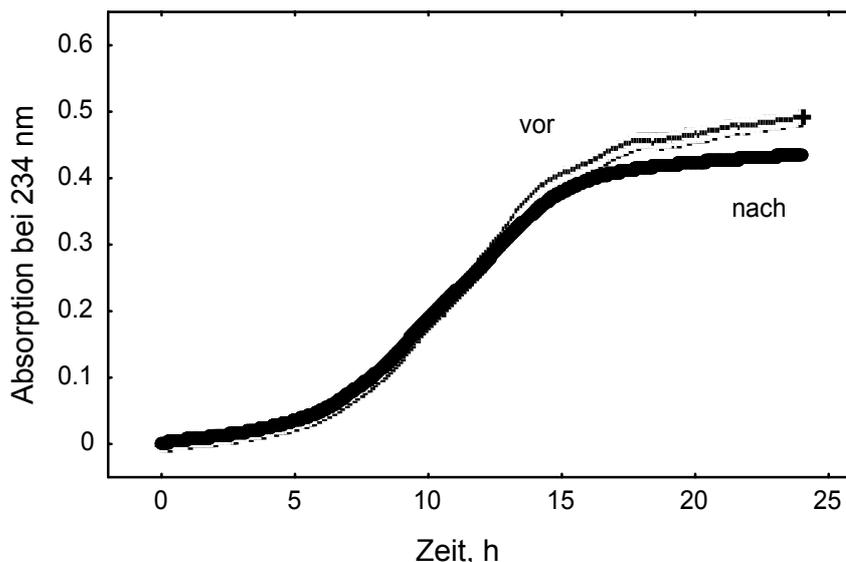


Abb. 21: Oxidationskinetik der AAPH induzierten Liquoroxidation bei 234nm vor und nach Supplementierung

Die Berechnung der Kinetik in der Lag- und Propagation Phase erfolgt durch zwei Geraden, die den Kurven angelegt werden. Mittels linearer Regressionsanalyse können dann anhand der Kurven die Werte ermittelt werden, wie bereits beschrieben für die Lag-Phase der Lipoproteinoxidation (Finckh et al., 1999; Regnstrom et al. 1993; Kontush et al., 1999). Die Dauer der Lag-Phase wird durch eine Abszisse im Schnittpunkt beider Geraden definiert.

Erfolgt eine nicht lineare Regressionsanalyse der gesamten Oxidationskurve, ergeben sich für die Dauer der Lag-Phase sehr ähnliche Werte. Für die Korrelation der beiden Rechenverfahren ergibt sich ein Wert von $r = 0,93$ bei der Auswertung von 10 Oxidationskurven.

In dieser Untersuchung kann keine signifikante Beeinflussung der AAPH induzierten Liquoroxidation festgestellt werden. Auf folgender Grafik (Abb. 22) abgebildet ist die Dauer der Lag-Phase der Liquoroxidation nach

AAPH Zugabe, die sich nach Supplementierung nicht signifikant verändert.

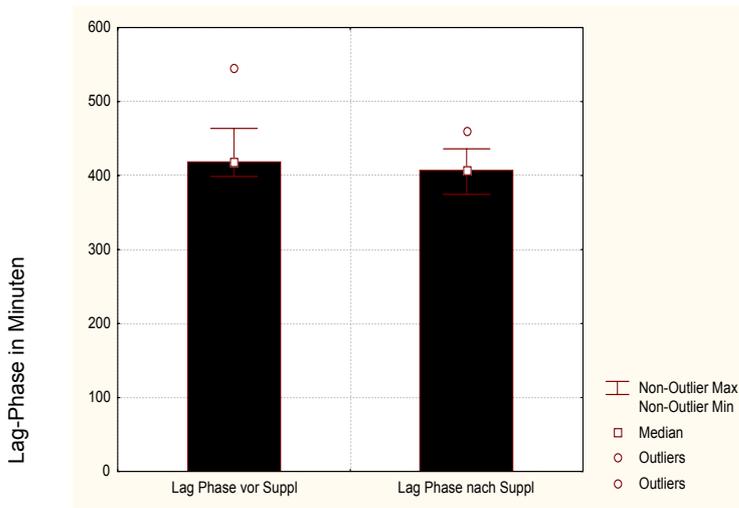


Abb 22: Dauer (min.) der Lag-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung

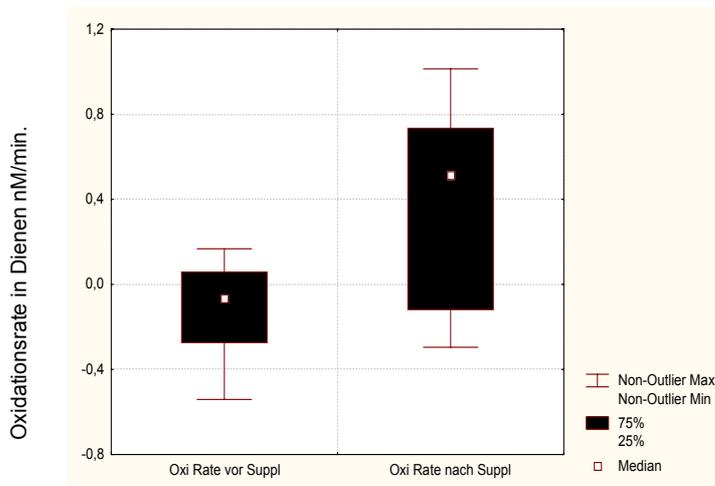


Abb. 23: Rate der Oxidation in der Lag-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung

Auf Abb. 23 ist die Rate dargestellt der AAPH induzierten Oxidation, ausgedrückt in nM Diene/min. Auch hier kann keine signifikante Veränderung durch Vitamin E Supplementierung bewirkt werden.

Wertet man die nächste Phase der Liquoroxidation, die Propagation Phase, hinsichtlich der Dauer und der Menge der entstandenen Oxidationsprodukte unter AAPH Zugabe aus, kann hier ebenfalls keine Wirksamkeit der Supplementierung festgestellt werden.

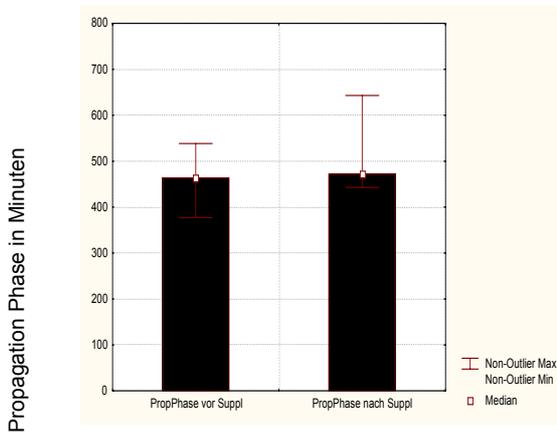


Abb. 24: Dauer der Propagation-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung

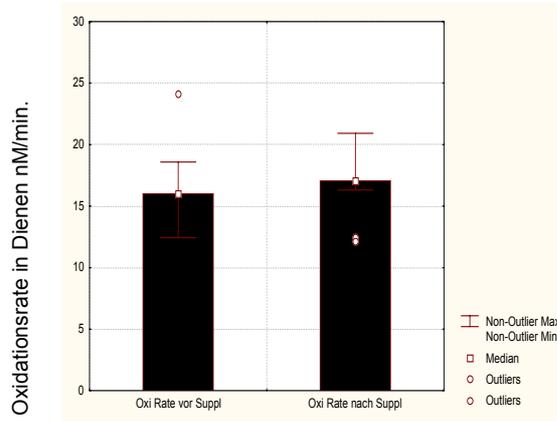


Abb. 25: Oxidationsrate der Propagation-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung

Untersucht wurde des Weiteren die Liquorautooxidation, d.h. die Kinetik der Liquoroxidation ohne pro-/antioxidative Substanzen, sowie das Verhalten der Kinetik unter Zugabe von EDTA als Antioxidans.

Die Autooxidation zeigt sich unbeeinflusst durch Vitamin E Supplementierung, sowohl den zeitlichen Ablauf, als auch die Oxidationsrate betreffend.

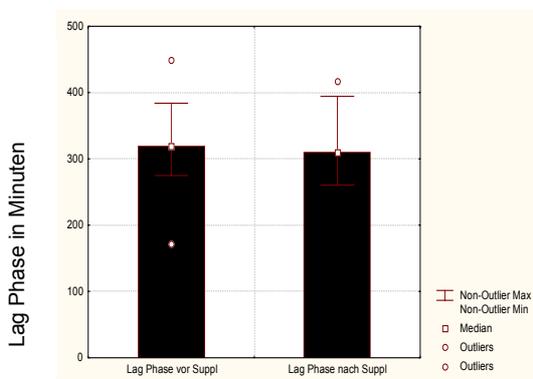


Abb. 26: Dauer der Lag-Phase der Liquorautooxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung

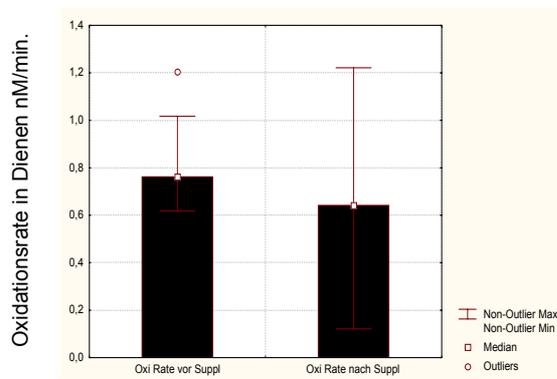


Abb. 27: Rate der Liquorautooxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung

Dargestellt ist im Säulendiagramm (Abb.26) die Dauer der Lag-Phase der Liquorautooxidation. Sie liegt vor Supplementierung im Median bei 318 min. und zeigt nach Supplementierung eine diskrete, nicht signifikante Verkürzung auf 310 min. Abb. 27 stellt die Oxidationsrate des Liquors dar, die zum ersten Messpunkt bei durchschnittlich 7,6nM/min. Dienen liegt und nach Supplementierung abfällt auf 6,4nM/min. Diene (nicht signifikant).

Die Verläufe der Propagation Phase sind vergleichbar und zeigen ebenfalls keine signifikante Reaktion auf die Behandlung mit Vitamin E.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von α -Tocopherol und weiteren lipophilen und hydrophilen Antioxidantien in Plasma und Liquor von Alzheimer Patienten sowie das Oxidationsverhalten im Sinne einer Senkung der Lipidoxidation in diesen beiden Kompartimenten nach 4wöchiger Supplementierung mit 400mg Vitamin E zu untersuchen.

Es sollte gezeigt werden, ob eine orale Supplementierung sich tatsächlich in erhöhten Liquorkonzentrationen widerspiegelt, ob eine Beeinflussung der übrigen Antioxidantien stattfindet und drittens, ob die Verläufe der α -Tocopherolkonzentration sich in Plasma und Liquor korrelieren lassen.

Kritisch anzumerken ist, daß sich mit einem kleinen Kollektiv von 10 Patienten nur Tendenzen darstellen lassen, die sich auch bei rechnerischer Signifikanz nicht ohne weiteres auf den klinischen Alltag übertragen lassen. Dieses sollte aber auch nicht Ziel der Arbeit sein.

Die erste Fragestellung konnte nach Auswertung der Messergebnisse eindeutig beantwortet werden: Die Empfindlichkeit der Lipoproteine gegenüber oxidativem Stress kann durch die 4wöchige Vitamin E Supplementierung nicht gesenkt werden, obwohl diese einen signifikanten Anstieg der Plasma- und vor allem auch der Liquorkonzentration des α -Tocopherols bewirkt.

Allerdings reicht die alleinige Zunahme der α -Toc Konzentration, bzw. die isolierte Vitamin E Substitution offensichtlich nicht aus, um die Konzentrationen anderer Plasma- und Liquorantioxidantien zu erhöhen.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß Lipoproteine im menschlichen Liquor während einer Inkubation bei 37°C (Artl et al., 2000) durch Oxidation modifiziert werden, und daß die *in vitro* Oxidierbarkeit von Plasma und Liquor bei Alzheimer Patienten signifikant höher ist, als in gesunden Kontrollgruppen (Schippling et al., 1999, Schippling et al., 2000, Kontush et al., 1999). Diese Daten konnten auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Basset et al., 1999). Passend dazu konnte gezeigt werden, daß sowohl die Konzentration der PUFAs des Liquors, die das Hauptsubstrat der Lipidperoxidation darstellen, als auch die Konzentrationen der antioxidativ wirkenden Vitamine bei Alzheimer Patienten im Verhältnis niedriger sind, als im Normalkollektiv. Auch dazu übereinstimmende Arbeiten (Montine et al., 1997).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese der Oxidation als wichtigem Faktor der Pathogenese des M. Alzheimer.

Auch durch mehrere in den letzten Jahren veröffentlichte Studien, die zeigen konnten, daß Hirngewebe von Alzheimer Patienten höhere Anteile an oxidativ modifizierten Biomolekülen, sowie eine höhere Basalrate der Lipidperoxidation aufweist, als Gehirne von Kontrollkollektiven, wird die Oxidationshypothese der Alzheimerschen Erkrankung weiter gestützt (Smith et al., 1991/1995; Montine et al., 1997; Lovell et al., 1995; Sayre et al., 1997). Das gültige Konzept der Oxidation bei AD wurde in letzter Zeit um einen wichtigen Aspekt erweitert. Neben der bekannten Problematik der Lipidoxidation werden die Lipoproteine als neues Ziel der Oxidation beschrieben. Die Liquor Lipoproteine stellen einen essentiellen Transporter der Lipide im Gehirn dar (Pitas et al., 1987; Krapp et al., 1995, Fagan et al., 1996). Durch oxidative Modifikation können ihre normale Funktion und cerebrale Entwicklungsvorgänge gestört werden. Außerdem können oxidierte Lipoproteine toxisch auf neuronale Zellen wirken (Bassett et al., 1999; Draczynska-Lusiak et al., 1998).

Zusätzlich zur Zunahme der Lipoprotein Oxidierbarkeit kann eine Abnahme der Konzentrationen der Antioxidantien in Plasma und Liquor bei AD Patienten gezeigt werden.

Ascorbat, das wichtigste hydrophile Antioxidans, ist signifikant erniedrigt und α -Tocopherol, das wichtigste lipophile Antioxidans, ist im Liquor von AD Patienten ebenfalls erniedrigt (Schippling et al., 1999 et 2000).

Aufgrund dieser Phänomene entschlossen wir uns im Rahmen dieser Arbeit zu der Supplementierung mit α -Toc, bzw. Vitamin E. In einer Folgearbeit wurde dann zusätzlich mit Ascorbat, bzw. Vitamin C supplementiert, wie weiter unten noch beschrieben wird.

Die hier erhobenen Daten zeigen, daß der antioxidative Effekt der Vitamin E Supplementierung die gesteigerte Lipoprotein Oxidierbarkeit der AD Patienten nicht kompensieren kann, wenn sich auch die α -Tocopherol Spiegel in Plasma und Liquor anheben lassen.

Da die alleinige Supplementierung mit Vitamin E keinen suffizienten Effekt auf die Hemmung der Oxidationsvorgänge in Plasma und Liquor von Alzheimer Patienten hat, lag die Überlegung nahe, die Supplementierung zu erweitern.

Die auf diese Arbeit folgende Untersuchung im Jahre 2000 durch Ujeyl et al. wertete Plasma- und Liquorproben von 10 Alzheimer Patienten aus, die 4 Wochen mit einer Kombination aus 400mg Vitamin E und 1000mg Vitamin C supplementiert wurden (Ujeyl, A. Diss. 2000). Im Gegensatz zu der isolierten Vitamin E Supplementierung konnten hier signifikante Senkungen der Lipoprotein Oxidierbarkeit sowohl im Plasma als auch im Liquor gemessen werden.

Die Plasma- und Liquor Konzentrationen von Ascorbat konnten auf das Normalniveau angehoben werden, auch der α -Toc Spiegel zeigte in beiden Kompartimenten einen signifikanten Anstieg (Kontush et al., 2001).

Die kombinierte Supplementierung kann also die bei der Alzheimer Demenz erhöhte Rate der Oxidierbarkeit der Lipoproteine und die erniedrigte Konzentration der Antioxidantien kompensieren.

Die geringe Antioxidantienkonzentration in Plasma und CSF bei AD Patienten kann sowohl durch ihren erhöhten Verbrauch - als Konsequenz hoher Level an oxidativem Stress in vivo – als auch durch ihre insuffiziente diätetische Verabreichung herrühren. In jedem Falle ist nach unserer Da-

tenlage eine Normalisierung der Konzentrationen durch orale Substitution möglich.

Der hohe Sauerstoffverbrauch des zentralen Nervensystems hat eine verstärkte Bildung von freien Radikalen zur Folge, wodurch der große Bedarf an antioxidativ wirkenden Molekülen erklärbar ist. Allerdings ist nur die Ascorbatkonzentration im Liquor 3-5-mal höher als im Plasma (Lonnrot et al., 1996), während alle lipophilen Moleküle im Liquor 100-500-mal niedriger konzentriert sind als im Plasma. Daher ist anzunehmen, daß Ascorbat im Liquor eine spezielle Rolle in der Protektion der Lipoproteine einnimmt. Ascorbat ist bekannt als das wichtigste hydrophile Antioxidans des Liquors (Schippling et al., 2000; Lnnrot et al., 1996). Es ist das Antioxidans, welches während der Plasma- (Frei et al., 1989) und Liquoroxidation (Arlt et al., 2000) als erstes verbraucht wird und die erste Linie ihrer antioxidativen Verteidigung darstellt.

α -Toc ist eines der wichtigsten lipophilen Antioxidantien im Menschen (Vatassery, 1998).

Der Hauptmechanismus seiner antioxidativen Wirkung beruht in der Inaktivierung von einem freien Radikal durch die Reduktion eines α -Toc Moleküls zu α -Tocopheroxyl und der unmittelbar folgenden Reaktion eines weiteren freien Radikals mit dem entstandenen α -Tocopheroxyl Radikal zu einem nichtradikalischen Produkt.

Dieser Mechanismus läuft nur ab bei einer hohen Rate von freien Radikalen, also unter stark oxidativen Konditionen. Unter schwach oxidativen Bedingungen kann sich die antioxidative Aktivität des α -Tocopherols auch in eine prooxidative Aktivität umwandeln; wenn keine weiteren freien Radikale auf ein Lipoprotein treffen und mit dem α -Tocopheroxyl Radikal interagieren, kann dieses unter Umständen direkt zu einer H-Abstraktion an PUFAs führen, d.h. der Oxidation eines Lipoproteinpartikels. Dieses Schema der α -Tocopherol induzierten Peroxidation (McKhann et al., 1984) macht deutlich, daß das Schicksal des α -Tocopheroxyl Radikals ausschlaggebend für die antioxidative Wirkung des α -Tocopherols ist.

α -Tocopheroxyl Radikale müssen wieder zu α -Toc regeneriert werden, damit das α -Toc seine antioxidative Wirkung entfalten kann. Die Eliminierung des α -Tocopheroxyl Radikals durch direkte Wiederumwandlung in α -

Toc repräsentiert einen wichtigen Mechanismus einer großen Gruppe von Verbindungen, den sog. α -Tocopherol Co-Antioxidantien (Bowry et al., 1995). Unter diesen scheint Ascorbat wegen seiner hohen Konzentration im Plasma und vor allem Liquor im physiologischen Ablauf das wichtigste zu sein.

Daraus lässt sich erklären, warum eine kombinierte Supplementierung mit Vitamin E und C gegenüber der alleinigen Vitamin E Supplementierung überlegen ist.

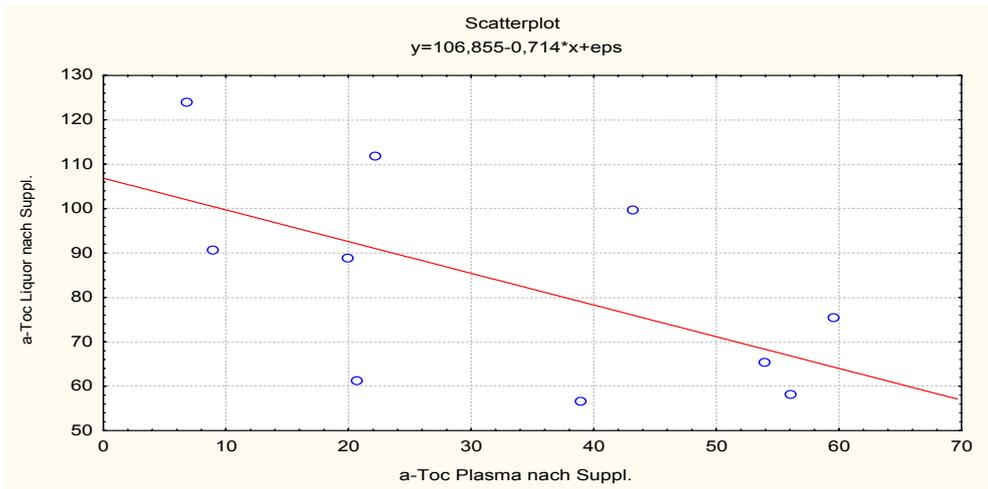
Ein anderer Grund für die insuffiziente Wirkung des Vitamin E könnte in dem signifikant niedrigeren Erkrankungsalter der Vitamin E supplementierten Patientengruppe ($60,0 \pm 8,3$ Vit. E vs. $67,15 \pm 7,6$ Vit. C+E) liegen, welches zwar ein frühes Stadium bei einer aber schwerer verlaufenden Erkrankung anzeigen könnte, bei der Vitamin E nicht ausreichend wirken kann.

Bei einer progredient verlaufenden Erkrankung wie dem M. Alzheimer wäre wahrscheinlich eine länger andauernde und/oder höher dosierte Supplementierung indiziert, um einen protektiven Effekt ähnlich dem von Sano et al. 1997 klinisch beobachteten Benefit zu erzielen.

Die optimale Dosierung und Dauer der Supplementierung müsste an größeren Fallzahlen über einen längeren Zeitraum als 4 Wochen gegen ein nicht supplementiertes Kontrollkollektiv getestet werden. Fraglich wäre in einer derartigen Studie allerdings die ethische Vertretbarkeit, da dem Kontrollkollektiv ein zumindest biochemisch nachgewiesener positiver Effekt der Vitamin E+C Supplementierung vorenthalten würde.

Weiter überdacht werden müsste auch die Methode der Therapiekontrolle, da eine Lumbalpunktion erstens für die Patienten relativ belastend ist, und zweitens nur der Kontrolle der biochemischen Verlaufsparemeter dient.

Die dritte Frage, die wir uns zu Beginn der Arbeit gestellt hatten war, ob sich Plasma- und Liquorspiegel des α -Tocopherols korrelieren lassen, um so eine weniger invasive Möglichkeit der Therapiekontrolle zu haben. Es hat sich aber gezeigt, daß eine negative Korrelation vorliegt. Dazu sei hier noch einmal die bekannte Abbildung 18 von S. 37 dargestellt.



Unklar ist, wie es zu dieser negativen Korrelation kommt. Messmethodische Fehler sind sehr unwahrscheinlich, da die getrennt beurteilten Messwerte für Plasma und Liquor signifikante und homogene Ergebnisse ergeben.

Näher liegt die Vermutung, daß Transportmechanismen der Blut-Hirn-Schranke obiges Phänomen verursachen: α -Tocopherol wird üblicherweise durch Plasma Lipoproteine transportiert. In den liquiden Kompartimenten spielt auch Afamin als spezifisches α -Tocopherol Bindungsprotein eine entscheidende Rolle (Voegele et al., 2002). Afamin ist ein 87kDa Plasma Glycoprotein welches 1997 charakterisiert wurde (Jerkovic et al., 1997; Voegele et al., 1999). Es ist ein genetisch ein Mitglied der Albumin Familie, und hat spezifische Bindungsstellen für α -Tocopherol und γ -Tocopherol mit einer sehr hohen Bindungskapazität (Voegele et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, daß Afamin unter oxidativen Bedingungen in vitro einerseits durch Vitamin E-Bindung und Transport eine neuroprotektive Funktion hat, es allerdings auch ungebunden kortikale Zellen vor oxidativem Schaden schützen kann (Heiser et al., 2002).

Bei den Patienten, die nach Substitution hohe α -Tocopherol Spiegel im Plasma, aber niedrige Liquorspiegel aufweisen, könnte eine Insuffizienz des Afamin Transportsystems vorliegen, während hohe Liquorspiegel und niedrige Plasmaspiegel nach Supplementierung hinweisend für einen sehr effektiven Transport durch Afamin sein könnten. Auf mögliche Ursachen hierfür soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Selbst ohne das Wissen über die genauen Transportmechanismen, die effizienteste Verabreichungsart und Unklarheit über Menge und Dauer der Supplementierung lässt sich für den klinischen Alltag diese einfach anzuwendende, wenig kostenintensive und nebenwirkungsarme Therapie für Alzheimer Patienten empfehlen, sei es auch nur als supportive Begleittherapie.

6. Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz ist eine Erkrankung mit multifaktorieller Genese, nach wie vor ist aber der endültige Pathomechanismus unklar. Dennoch scheinen die Oxidationsvorgänge im Liquor cerebrospinalis eine entscheidende Rolle zu spielen.

Aufgrund dessen sollten in dieser Studie die Oxidationsraten mit antioxidativ wirkenden Substanzen reduziert werden.

Es sollte ein Antioxidans eingesetzt werden, welches seine antioxidative Wirksamkeit in vitro gezeigt hat, nebenwirkungsarm und leicht verfügbar ist; Kriterien, die auf das lipophile Antioxidans Vitamin E in Form des α -Tocopherol zutreffen.

Wir supplementierten 10 Alzheimer Patienten für 4 Wochen mit 400mg/die Vitamin E und erhoben die Messwerte für die Konzentrationen der hydrophilen und lipophilen Antioxidantien in Plasma und Liquor cerebrospinalis vor und nach Supplementierung. Außerdem wurden die Oxidationskinetik von Plasma und Liquor sowie die Lipidkonzentrationen zu beiden Zeitpunkten gemessen.

Gezeigt werden konnte ein signifikanter Anstieg der α -Tocopherol Konzentration sowohl im Plasma als auch im Liquor nach Supplementierung. Der Plasmaascorbatspiegel zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg, der im Liquor nicht zu finden war. Die übrigen Antioxidantien zeigten keine Beeinflussung durch die Vitamin E Gabe, ebenso wenig wie die Lipide (Plasma und CSF). Auch die Oxidationskinetik von Plasma und Liquor konnte durch die Supplementierung nicht verändert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die orale Vitamin E Substitution zwar zu einem Anstieg der Plasma- und Liquor Level desselben führt, für eine Beeinflussung der globalen Oxidationsabläufe aber offensichtlich nicht ausreichend ist.

Insgesamt ist die Vitamin E Supplementierung bei Alzheimer Patienten somit sinnvoll, es besteht aber noch erheblicher Bedarf an Studien mit größeren Kollektiven und an Langzeituntersuchungen, um diese laborchemischen Ergebnisse auf den klinischen Alltag übertragen zu können.

7. Literaturverzeichnis

- Arlt, S.; Finckh, B.; Beisiegel, U. and Kontush, A. time-course of oxidation of lipids in human cerebrospinal fluid in vitro *Free Radic.Res.* **32**: 103-114; 2000
- Barja, G. and Hernandez, A. Vitamin C, Dehydroascorbate and Uric Acid in Tissues and Serum: High-Performance Liquid Chromatography. *Methods Enzymol.* **234**: 331-337; 1994
- Basset, C.N.; Neely, M.D.; Sidell, K.R.; Markesberry, W.R.; Swift, L.L. and Montine, T.J. Cerebrospinal fluid lipoproteins are more vulnerable to oxidation in Alzheimer's disease and are neurotoxic when oxidized ex vivo *Lipids* **34**: 1273-1280; 1999
- Borghini, I., Barja, F., Pometta, D. and James, R.W., Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1255**: 192-200; 1995
- Bowry, V.W. and Stocker, R., Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of Vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**: 6029-6044; 1993
- Burton, G.W. und Ingold, K.U. Mechanisms of Antioxidant Action : Preventive and Chainbreaking Antioxidants. In : *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biochemistry. Vol II* : 29-43, 1988
- Bush, A.I., Metals and Neuroscience. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **4**: 184-191; 2000

- Classen, M. Laborwerte, Referenzbereiche. In: Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. Innere Medizin. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 1684; 1993
- Citron, M.; Oltersdorf, T.; Haass, C.; McConlogue, L.; Hung, A.Y.; Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Lieberburg, I. and Selkoe, D.J. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer`s disease increases beta-protein production. *Nature* **360(6405)**: 672-674; 1992
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jürgens, G., The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, **13**: 341-390; 1992
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, , Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Comm.*, **19**: 267-278; 1989
- Finckh, B.; Kontush, A.; Commentz, J.; Hübner, C.; Burdelski, M. and Kohlschütter, A. Monitoring of Ubiquinol-10, Ubichinone-10, Carotenoids and Tocopherols in Neonatal Plasma Microsamples using High-Performance-Liquid-Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection. *Anal. Biochem.* **232**: 210-216; 1995
- Finckh, B.; Kontush, A.; Commentz, J.; Hübner, C.; Burdelski, M.; Kohlschütter, A. High-Performance liquid chromatography-coulometric electrochemical detection of ubiquinol 10, ubiquinone 10, carotenoids and tocopherols in neonatal plasma. *Methods Enzymol.* **299**: 341-348; 1999

- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Oxygen is poisonous – an introduction to oxygen toxicity and free radicals. In Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Hrsg.), *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, 1-21; 1989
- Hardy, J., Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**: 154-159; 1997
- Heiser, M.; Hutter-Paier, B., Jerkovic, L.; Pfragner, R.; Windisch, M.; Becker-Andre, M. and Dieplinger, H. Vitamin E binding protein afamin protects neuronal cells in vitro *J Neural Transm Suppl*, **62**: 337-345; 2002
- Hensley, K.; Butterfield, D.A.; Hall, N.; Cole, P.; Subramaniam, R.; Mark, R.; Mattson, M.P.; Markesbery, W.R.; Harris, M.E. and Aksenov, M. Reactive oxygen species as causal agents in the neurotoxicity of the Alzheimer's disease-associated amyloid beta peptide. *Ann N Y Acad Sci*; **786**: 120-134; 1996
- Kontush, A.; Meyer, S.; Finckh, B.; Kohlschütter, A. and Beisiegel, U., Alpha-tocopherol as a reductant for Cu(II) in human lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 11106-11112; 1996
- Kontush, A.; Hübner, C.; Finckh, B.; Kohlschütter, A. and Beisiegel, U. Low Density Lipoprotein oxidizability by copper correlates to its initial ubiquinol-10 and polyunsaturated fatty acid content. *FEBS Lett.* **41**: 69-73; 1994
- Kontush, A. and Beisiegel, U., Measurement of oxidizability of blood plasma. *Methods Enzymology*, **299**: 35-49; 1999

- Kontush,A., Hübner,C., Finckh,B., Kohlschütter,A. and Beisiegel,U., Antioxidative activity of ubiquinol-10 at physiologic concentrations in human low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1258**: 177-187; 1995a
- Kontush, A., Finckh, B.; Karten, B.; Kohlschütter, A. and Beisiegel, U. Antioxidant and prooxidant activity of α -Tocopherol in human blood plasma and low density lipoprotein. *J.Lipid Res.* **37**: 1436-1448; 1996
- Kontush, A.; Spranger, T.; Reich, A.; Djahansouzi, S.; Karten, B.; Braesen, J. H.; Finckh, B.; Kohlschütter, A. and Beisiegel, U. Whole plasma oxidation assay as a measure of lipoprotein oxidizability. *BioFactors* **6 (2)**: 99-109; 1997
- Krapp, A., Zhang, H., Ginzinger, D., Liu, MS., Lindberg, A., Olivecrona, G., Hayden, MR., Beisiegel, U. Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J Lipid Res.* **36(11)**: 2362-2373
- Lautenschlager, N., Kurz, A. und Müller, U. Erbliche Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit. *Nervenarzt* **70**: 195-205; 1999
- Lönnrot, K., Metsä-Ketelä, T., Molnar, G., Ahonen, J.-P., Latvala, M., Peltola, J., Pietilä, T., Alho, H. The effect of ascorbat and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. *Free radical Biol. and Med.* **21**: 211-217; 1996
- Lovell, M.A.; Ehmman, W.D.; Butler, S.M. and Markesbery, W.R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer`s disease. *Neurology* **45**: 1594-1601; 1995

- Ma, Y.-S., Stone, W.S. and LeClair, I.O., The effects of Vitamin C and Urate on the oxidation kinetics of human low density lipoprotein, *P.S.E.B.M.*, **206**: 53-59; 1994
- Mandelkow, E.-M. Die neurofibrilläre Pathologie der Alzheimer-Demenz und das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau. In: *Alzheimer Krankheit*. Rösler, M. et al. (Hrsg.), Belz, Weinheim, 130-143; 1997
- Mark, R.J., Blanc, E.M. and Mattson, M.P., Amyloid beta-peptide and oxidative injury in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.*, **12**: 211-224; 1996
- Markesbery, W.R., Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **23**: 134-147; 1996
- McKhann, G.; Drachmann, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D. and Stadlan, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*; **34**: 939-944; 1984
- Montine, K.S.; Olson, S.J.; Amarnath, V.; Whetsell, W.O., Jr.; Graham, D.G. and Montine, T.J. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of APOE4. *Am.J.Pathol.* **150**: 437-443; 1997
- Montine, T.J.; Montine, K.S. and Swift, L.L. Central Nervous system lipoproteins in Alzheimer's disease. *Am.J.Pathol.* **151**: 1571-1575; 1997
- Multhaup, G.; Ruppert, T.; Schlicksupp, A.; Hesse, L.; Beher, D.; Masters, C.L.; Beyreuther, K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **54**: 533-539; 1997

- Müller-Hill, B. and Beyreuther, K.; Molecular biology of Alzheimer`s disease. *Annu Rev biochem*; **58**: 287-307; 1989
- Niki,E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, **44**: 227-253; 1987
- Regnstrom, J.; Strom, K.; Moldeus, P.; Nilsson, J. Analysis of lipoprotein diene formation in human serum exposed to copper. *Free Radical Res. Commun.* **19**: 267-278; 1993
- Sandbrink, R. et Beyreuther,K. Alzheimer-Krankheit (Wenn die Amyloid- Sanduhr läuft). *Neuroforum*, **3** : 84-98; 1997
- Sano, M.; Ernesto, C.; Thomas, R.; Klauber, M. R.; Schäfer, K.; Grundman, M.; Woodbury, P.; Growdon, J.; Cotman, C.; Pfeiffer, E.; Schneider, L. S.; Thal, L. J. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer`s disease. *N. Engl. J. Med.* **336**: 1216-1222; 1997
- Sayre, L.M.; Zelasko, D.A.; Harris, P.L.; Perry, G.; Salomon, R.G. and Smith, M.A. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer`s disease. *J.Neurochem.* **68**: 2092-2097; 1997
- Schippling, S.; Kontush, A.; Arlt, S.; Daher, D.; Buhmann, C.; Stürenburg, H.J.; Mann, U.; Müller-Thomsen,T and Beisiegel, U. Lipoprotein oxidation and Alzheimer`s disease. *Alzheimer`s Disease and Related Disorders* Eds Iqbal, K.; Swaab, D.F.; Winblad, B.; Wisniewski, H.M.: 471-477; 1999
- Schippling, S.; Kontush, A., Arlt; S., Buhmann, C.; Stürenburg, H.; Mann, U.; Müller-Thomsen, T.; Beisiegel, U. Increased lipo-

protein oxidation in Alzheimer`s disease. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 351-360; 2000

- Selkoe, D.J. Alzheimer`s disease: Genotypes, Phenotypes and Treatments. *Science* **275(5300)**: 630-631; 1997
- Selkoe, D.J. Images in neuroscience. Alzheimer`s disease: From genes to pathogenesis. *Am J Psychiatry*, **154(9)**: 1998
- Selkoe, D.J.; Ihara, Y. and Salazar, F.J.; Alzheimer`s disease: insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* **215(4537)**: 1243-1245 ; 1982
- Selkoe, D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer`s disease. *Nature*.**399**: A23-31; 1999
- Sevanian, A., Davies, K.J.A. and Hochstein, P. J. Conservation of Vitamin C by uric acid in blood. *Free Radicals Biol. and Med.* **1**: 117-124; 1985
- Smith, C.D.; Carney, J.M.; Starke Reed, P.E.; Oliver, C.N.; Stadtmann, E.R.; Floyd, R.A. and Markesbery, W.R. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer`s disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**: 10540-10543; 1991
- Smith,M.A., Sayre,L.M., Monnier,V.M. and Perry,G., Radical AGEing in Alzheimer`s disease. *Trends Neurosci.*, **18**: 172-176; 1995
- Smith, M.A.; Sayre, L.M.; Vitek, M.P.; Monnier, V.M. and Perry, G. Early AGEing and Alzheimer`s *Nature* **374**: 316-316; 1995
- Spector, R. Vitamin homeostasis in the central nervous system. *N.Engl.J.Med.* **296**: 1393-1398; 1977

- Steinberg,D., Parthasarathy,S., Carew,T., Khoo,J. and Witztum,J., Mechanisms of disease, beyond cholesterol, modifications of low density lipoprotein that increase it's atherogenicity. *New Engl. Journ. of Med.*, **320/14**: 915-924; 1989
- Stocker, R. Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Curr.Opin.Lipidol.* **5**: 422-433; 1994
- Stocker,R. and Frei,B., Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies, editor. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, publishers. London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo. 213-243; 1991
- Stocks, J., Gutteridge, J. M. C., Sharp, R. J., Dormandy, T. L. The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and alpha-tocopherol. *Clin. Sci. Mol. Med.* **47 (3)**: 223-233; 1974
- Stryer, L., Biliverdin und Bilirubin sind Zwischenprodukte beim Hämabbau. In: *Biochemie*, 622-623, **Aufl.1990**, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akad.Verlag, 1994
- Ujeyl, A.Med. Dissertation. Universität Hamburg; 2000
- Vatassery, G.T. Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. *Geriatrics* **53 Suppl 1**: S25-S27; 1998
- Voegelé, A.F.; Jerkovic,L.; Wellenzohn, B.; Eller, P.; Kronenberg, F.; Liedl, K.R. and Dieplinger, H. Characterization of the vi-

tamin E-binding properties of human plasma Afamin. *Biochemistry* **41 (49)**:14532-8; 2002

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Alzheimer Plaque, Silberfärbung, aus: C. Thomas, Histopathologie, Schattauer Verlag, 2001	4
Abbildung 2: prominente Alzheimer Patientin Rita Hayworth, aus: Möller/Laux/Deister, Psychiatrie, Hippokrates Verlag, 1995	5
Abbildung 3: Test zur Beurteilung von Störungen höherer kortikaler Leistungen, aus: Möller/Laux/Deister, Psychiatrie, Hippokrates Verlag, 1995	6
Abbildung 4: Alzheimer Fibrille, Braunmühlfärbung, aus: C.Thomas, Histopathologie, Schattauer Verlag, 13.Aufl., 2001	7
Abbildung 5: Mechanismus der Lipidperoxidation, aus Gutteridge, J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995	11
Abbildung 6: Schematischer Verlauf der Liquoroxidation, Absorptionsänderung bei 234 nm, aus Diss. Kathrin Semmler, Universität Hamburg, 2003	12
Abbildung 7: Ascorbat und dehydro-Ascorbat, aus: G.Löffler, Funktionelle Biochemie, Springer Verlag, 1993	14
Abbildung 8: α -Tocopherol als Redoxsystem, aus: G.Löffler, Biochemie, Springer Verlag, 1993	16
Abbildung 9: Ascorbatkonzentration (μM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung	30

Abbildung 10: Bilirubinkonzentration (μM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung	30
Abbildung 11: Urat- und SH- Gruppenkonzentration (μM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung	31
Abbildung 12: α -Tocopherolkonzentration (μM) im Plasma vor und nach Vitamin E Supplementierung	32
Abbildung 13: Autooxidation des Plasmas vor und nach Vitamin E Supplementierung	34
Abbildung 14: Plasmaoxidation mit AAPH vor und nach Vitamin E Supplementierung	34
Abbildung 15: Ascorbat- und Uratkonzentration (μM) im Liquor und 16 vor und nach Vitamin E Supplementierung	35
Abbildung 17: α -Tocopherolkonzentration (μM) im Liquor vor und nach Vitamin E Supplementierung	36
Abbildung 18: Korrelation der α -Tocopherol Plasma - und Liquorkonzentration nach Vitamin E Supplementierung	37
Abbildung 19: Korrelation von α -Tocopherol im Liquor vor und nach Vitamin E Supplementierung, α -Tocopherolkonzentration in nM	37
Abbildung 20: α -Tocopherolkonzentration der einzelnen Liquorproben vor und nach Vitamin E Supplementierung	38

Abbildung 21: Oxidationskinetik der AAPH induzierten Liquoroxidation bei 234 nm vor und nach Supplementierung	39
Abbildung 22: Dauer (min.) der Lag-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung	40
Abbildung 23: Rate der Oxidation in der Lag-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung	40
Abbildung 24: Dauer der Propagation-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung	41
Abbildung 25: Oxidationsrate der Propagation-Phase der AAPH induzierten Liquoroxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung	41
Abbildung 26: Dauer der Lag-Phase der Liquorautooxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung	41
Abbildung 27: Rate der Liquorautooxidation vor und nach Vitamin E Supplementierung	41
Tabelle 1: Charakteristika des Kollektivs	19
Tabelle 2: Charakteristika des Patientenkollektivs	29
Tabelle 3: Hydrophile Antioxidantien im Plasma, Werte in μM , n=10 vor und nach Supplementierung	31

Tabelle 4: Lipophile Antioxidantien im Plasma, Werte in μM , n=10	32
Tabelle 5: Plasmalipide vor und nach Vitamin E Supplementierung in mg/dl, bzw. %, n=10	33
Tabelle 6: hydrophile Antioxidantien im Liquor in μM , Ascorbat n= 10, Urat n= 9	36
Tabelle 7: Liquorlipide vor und nach Vitamin E Supplementierung In mg/dl, bzw. %, n=10	38

Danksagung

In erster Linie gilt mein tiefer Dank Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für Ihre große Geduld und immer wiederkehrende energische Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Auch Nicolette Donarski und dem ganzen Team der MTAs und wissenschaftlichen Mitarbeiter danke ich für die technische und emotionale Unterstützung während der Erhebung der Daten und Messwerte, die Arbeitsatmosphäre im Labor war jederzeit sehr freundschaftlich und motivierend.

Für die unmittelbare wissenschaftliche Betreuung danke ich Herrn Dr. A. Kontush und Herrn Dr. S. Arlt, die jederzeit für Fragen offen waren und Hilfestellung leisteten.

Für die Gewinnung und Bereitstellung der Blut- und Liquorproben danke ich Herrn Prof. Dr. T. Müller-Thomsen und Frau Dr. Ulrike Mann aus der Gedächtnissprechstunde der psychiatrischen Klinik des UKE.

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie zu Dank verpflichtet, die mich die letzten Jahre andauernd unterstützt und angespornt hat, wenn die Arbeit stagnierte, ebenso wie Prof. F. Jänicke und Prof. Ch. Thomssen aus der Frauenklinik des UKE für ihre Geduld und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Curriculum Vitae

Name: Charlotte Maria Ganders
geb. Lührs

Adresse: Weiherstrasse 6
60314 Frankfurt

Telefon: 069/ 36708057
0179/4596313

e-mail: ch.ganders@ganders-hh.de

Geburtsdatum: 03.09.1974

Geburtsort: Hamburg

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Ausbildung

1981 - 1993	Grundschule/ Heilwig-Gymnasium	Hamburg/ Bangkok
09/1993	Abitur (Note 1,4)	
1993 - 1999	Universitätsklinikum Eppendorf Studium der Humanmedizin	Hamburg
09/1995	Physikum	
08/1996	1. Staatsexamen	
03/1999	2. Staatsexamen	
05/2000	3. Staatsexamen (Gesamtnote 1,99)	
1999 - 2000	Praktisches Jahr Innere Medizin, AK Barmbek Gynäkologie, UK Eppendorf Chirurgie, AK St.Georg GT Hospital	Hamburg Bombay
2000 - 2002	Ärztin im Praktikum UK Eppendorf, Frauenklinik	Hamburg
Seit 01/2002	Assistenzärztin UK Eppendorf, Frauenklinik	Hamburg
Seit 07/2007	Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe	

Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht im Journal of Free Radical and Biological Medicine , „Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer´s disease“. **31(3): 345-54**, 2001; Kontush, A.; Mann, U.; Arlt, S.; Ujevl, A.; Luhrs, C.; Muller-Thomsen, T. and Beisiegel, U.

Ort

Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.