

Institut für Medizinische Biochemie
und Molekularbiologie
- Abteilung für Molekulare Zellbiologie -
Direktorin: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Die Wirkung der in vivo Supplementation von
Vitamin E und Vitamin C
auf den Oxidationsstoffwechsel bei Alzheimer-Patienten**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Amaar Ujeyl
aus Wilhelmshaven

Hamburg
2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
Der Universität Hamburg am: 5.12.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Korreferent: --

1 EINLEITUNG	3
1.1 Morbus Alzheimer – die Krankheit	3
1.1.1 Einleitung	3
1.1.2 Epidemiologie	3
1.1.3 Klinisches Bild	3
1.1.4 Neuropathologisches Korrelat.....	4
1.1.5 Ätiologie	4
1.2 Oxidativer Streß	6
1.2.1 Entstehung freier Radikale.....	6
1.2.2 Das Gehirn als Angriffsziel freier Radikale	7
1.2.3 Spurenelemente als Quelle von oxidativem Stress bei AD.....	8
1.2.4 Lipidperoxidation	9
1.2.5 DNS Oxidation in AD.....	10
1.2.6 Protein-Modifikation, Aß und AGE	10
1.2.7 Exzitotoxizität	12
1.2.8 Fazit	12
1.3 Das antioxidative Abwehrsystem des Körpers.....	12
1.3.1 Wasser-lösliche Antioxidantien	14
1.3.2 Lipophile Antioxidantien	19
1.4 Oxidative Parameter und AD	25
1.5 Therapeutischer Einsatz von Antioxidantien bei der Behandlung der AD.....	25
1.5.1 Argumente für eine Supplementationstherapie	25
1.5.2 Probleme und ungeklärte Fragen	27
1.6 Problemstellung	28
 2 MATERIAL UND METHODEN	 29
2.1 Geräte.....	29
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	29
2.3 Patienten	30
2.4 Vorbereitung der Plasmaproben und Supplementierung	31
2.5 Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien	31
2.5.1 Vitamin-C Bestimmung in Plasma und Liquor	31
2.5.2 Harnsäure-Bestimmung im Plasma.....	33
2.5.3 Bilirubin-Bestimmung im Plasma.....	34
2.5.4 SH-Gruppen-Bestimmung im Plasma	35

2.6 Lipophile Antioxidantien.....	36
2.6.1 Cholesterin- und Fettsäuren-Messung im Liquor.....	36
2.6.2 Cholesterin- und Fettsäuren-Bestimmung im Plasma	37
2.6.3 Chromatographische Bestimmung der lipophilen Antioxidantien.....	38
2.7 Bestimmung der Oxidierbarkeit von Plasma und Liquor	40
 3 ERGEBNISSE	 42
3.1 Beschreibung des Alzheimer-Gesamtkollektivs.....	42
3.1.1 Plasma.....	42
3.1.2 Liquor	50
3.2 Ergebnisse der Supplementation	55
3.2.1 Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien in Plasma und Liquor	55
3.2.2 Bestimmung der lipophilen Antioxidantien.....	58
3.2.3 Fettsäuren und Cholesterin.....	62
3.2.4 Oxidationskinetik im Plasma	68
3.2.5 Oxidationskinetik im Liquor	72
3.3 Vergleich des Suppletionskollektivs – mit einem gesunden Vergleichskollektiv	77
3.3.1 Plasma.....	77
3.3.2 Liquor	81
 4. DISKUSSION	 83
4.1 Bestimmung der Antioxidantien.....	83
4.1.1 Hydrophile Antioxidantien	83
4.1.2 Lipophile Antioxidantien	83
4.1.3 Ergebnis der Supplementation	85
4.2 Oxidations-Parameter.....	87
4.2.1 Fettsäuremuster in Plasma und Liquor	87
4.2.2 Oxidationskinetik	87
4.2.3 Oxidationskinetik im Verlauf der Supplementation.....	88
4.2.4 Fazit	90
4.3 Medizinische Bedeutung	91
 5. ZUSAMMENFASSUNG	 93
 6. ABKÜRZUNGEN	 95
 7. LITERATURANLAGE	 97

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer – die Krankheit

1.1.1 Einleitung

Der Morbus Alzheimer, benannt nach dem deutschen Psychiater und Neurologen Alois Alzheimer (1864-1915), ist eine progredient verlaufende degenerative Erkrankung des ZNS. Sie führt innerhalb weniger Jahre zur kortikalen Demenz. Der Morbus Alzheimer manifestiert sich überwiegend im höheren Lebensalter und ist die häufigste Form der Alters-Demenz (Markesbery 1997). 5-10% aller Menschen jenseits des 65. Lebensjahres sind betroffen.

1.1.2 Epidemiologie

Obwohl die Alzheimer Demenz (AD) zu jedem Zeitpunkt im erwachsenen Lebensalter auftreten kann, befindet sich die Mehrheit der Patienten in der 6. Lebensdekade oder ist noch älter. Mit 20% aller Patienten in psychiatrischen Krankenhäusern und einem noch höheren Anteil in Altersheimen ist die AD Erkrankung eine der häufigsten Geisteskrankheiten überhaupt. Die Inzidenzrate ist weltweit ähnlich und liegt jährlich pro 100000 Einwohnern bei 125 neuen Fällen nach dem 60. Lebensjahr (Adams et al. 1999).

1.1.3 Klinisches Bild

Bevor das charakteristische klinische Bild mit Gedächtnisstörungen und anderen spezifischen kognitiven Defekten evident wird, stehen weniger charakteristische Klagen wie Kopfschmerz, Schwindel, Unruhe, Schlafstörungen, eine allgemeine Leistungsschwäche sowie eine depressive Verstimmung im Vordergrund. Im Verlauf der Krankheit stellen sich zunehmend Aphasien, Apraxien, Raumsinn- und Raumverarbeitungsstörungen, Vergeßlichkeit, Desorientiertheit und andere kognitive Defizite ein (Mummenthaler et al. 1997). Im Spätstadium der Erkrankung treten



Abbildung 1: kortikale Atrophie; oben: Morbus Alzheimer; unten Morbus Pick (Kleihues et al. 1997, S. 291)

weitere neuropsychologische Ausfälle sowie neurologische Symptome auf, die zum völligen Verlust der Kommunikationsfähigkeit und Selbstständigkeit der betroffenen Person führen können.

1.1.4 Neuropathologisches Korrelat

Im fortgeschrittenen Stadium entwickelt sich eine ausgeprägte kortikale Hirnatrophie. Das Gehirn atrophiert diffus und verliert um bis zu 20 Prozent oder mehr an Gewicht. Der mikroskopische Befund ist durch die charakteristische Trias von

1. Alzheimer-Fibrillen-Veränderungen im Zytoskelett betroffener Ganglienzellen (Neurofibrillary tangles, NFT)
2. Neuritischen Plaques im Neuropil (auch senile Plaques genannt) und
3. Amyloidablagerungen in kleinen zerebralen und leptomenigealen Arterien (Amyloid-Angiopathie)

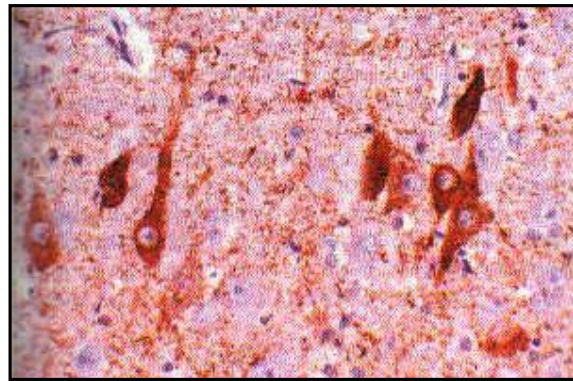


Abbildung 2: Neurone mit Alzheimer-Fibrillen-Veränderungen (Kleihues et al. 1997, S. 291)

gekennzeichnet (Markesbery 1997; Böcker et al. 1997). Hyperphosphoryliertes Tau(τ)-Protein und Amyloid- β -Peptid (A β) sind die häufigsten Proteine in den NFT. Neuritische Plaques und Alzheimer-Fibrillen werden im gesamten Assoziationskortex gefunden, die Schwere der Demenz korreliert aber nur mit den Alzheimer Fibrillen und den neuronalen Veränderungen und nicht mit den neuritischen Plaques (Adams et al. 1999).

Die AD geht mit einer Veränderung des Gleichgewichts verschiedener Neurotransmittersysteme einher. Es kommt zu einem Verlust der cholinergen Marker Acetyltransferase und Acetylcholinesterase. Daneben manifestieren sich u.a. Defizite an Serotonin und Noradrenalin (Markesbery 1997).

1.1.5 Ätiologie

Die AD hat eine multifaktorielle Pathogenese, in der neben „normalen“, alters-bedingten degenerativen Veränderungen, genetische prädisponierende Faktoren und Umwelteinflüsse das Erkrankungspotential des Individuums bestimmen (Münch et al. 1996). Eine Reihe von ätio-

logisch/pathogenetischen Hypothesen wurde für AD formuliert (Markesbery 1997). Der Übersicht halber seien hier nur einige von ihnen ausführlicher erwähnt.

1. Genetische Prädispositionen (Amyloid-Precursor-Protein (APP), Presenilin (PS) - Mutationen sowie Apo-E4-Genotyps)
2. Energie-Metabolismus
3. Oxidativer Stress

Genetische Prädispositionen

Der Genotyp (E) 4/4 des Apolipoprotein E gilt inzwischen als gesicherter Risikofaktor für die familiäre und sporadische „late onset“ AD. Apolipoprotein E, ein Regulator des Lipidstoffwechsels, zeigt eine hohe Affinität zum A β in den Alzheimer-Plaques. Das Auftreten der Isoform Apolipoprotein E4 (Allel ϵ 4 auf Chromosom 19) verdreifacht das Risiko, die sporadische Form der AD zu bekommen und je mehr Apo ϵ 4-Allele vorhanden sind, desto niedriger ist das Alter des Patienten beim Ausbruch der AD. Bis zu 90% der Individuen, die homozygot in bezug auf das Apo ϵ 4-Allel sind, entwickeln eine AD bis zum Alter von 80 Jahren.. Es wird vermutet, daß das Apolipoprotein E durch seine Interaktion mit APP oder dem τ -Protein die Plaques-Bildung beeinflusst.

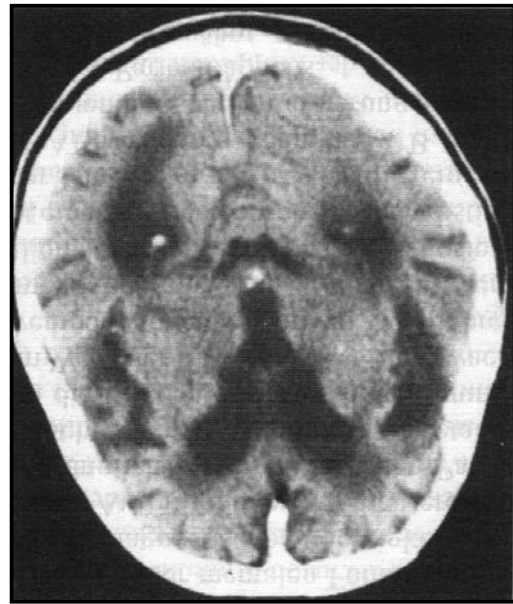
1. Mutationen im APP auf Chromosom 21 sind beschrieben worden bei einer Anzahl von Patienten mit familiärem „early-onset“ AD. Diese führen zu einer Überproduktion des neurotoxischen A β (Behl et al. 1994).
2. Außerdem sind eine Vielzahl verschiedener Punktmutationen, u.a. „missense“ Mutationen im Genlocus PS-1 und P-2 auf dem Chromosom 14 bzw. Chromosom 1 gefunden worden, die sich von den Mutationen des APP auf Chromosom 21 unterscheiden und ebenfalls mit einem frühen Ausbruch der Erkrankung in Verbindung gebracht werden.

Energie-Metabolismus

PET-Studies bei AD-Patienten zeigen einen reduzierten Glucose-Metabolismus, der nur z.T. durch die zunehmende Atrophie und Degeneration von Hirngewebe erklärt werden kann. Am stärksten davon betroffen sind parietale und temporale Assoziations-Cortex-Areale, relativ ausgenommen von diesem Phänomen sind primär sensible und motorische Areale (Sims et al.

1996). Verschiedene Störungen im Energie-Metabolismus sind bei AD-Patienten entdeckt worden, z.B. die Aktivitätsminderung des Pyruvat-Dehydrogenase-Enzymkomplex und Veränderungen in der Aktivität von Cytochrom C Oxidase (Sims et al. 1996).

Abbildung 3: Alzheimer Demenz (AD); die axiale CT zeigt eine schwere generalisierte zerebrale kortikale Atrophie und eine mäßig schwere Erweiterung der Ventrikel (Adams et al. 1999, S.1078)



1.2 Oxidativer Streß

1.2.1 Entstehung freier Radikale

Freie Radikale sind Atome bzw. Moleküle, die sich dadurch auszeichnen, daß sie in ihrer äußeren Elektronenhülle mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen. Sauerstoff-Radikale und damit verwandte andere freie Radikale entstehen in den Zellen aller sauerstoffabhängigen Organismen als Nebenprodukte des physiologischen Metabolismus. Einer der Hauptentstehungsorte sind Mitochondrien, in denen etwa 3-10% des Sauerstoffs nicht vollständig zu Wasser reduziert wird, sondern sich Sauerstoffradikale bilden. Eine weitere Quelle freier Radikale sind Autooxidationsreaktionen.

Darüber hinaus gibt es auch enzymatische Reaktionen, die zur Bildung von Sauerstoffradikalen führen, z.B. durch Oxidasen, Oxidoreduktasen und Peroxidasen. Im Verlauf von Entzündungsprozessen ist eine gezielte Produktion freier Radikale durch Leukozyten und Makrophagen zu beobachten, die der Abwehr von Bakterien und anderen Fremdkörpern dient. Nicht immer ist der eigene Organismus Ursprung der freien Radikale. Diese können auch in Bakterien und anderen Mikroorganismen entstehen und anschließend an den menschlichen Körper abgegeben werden. Umweltfaktoren wie Röntgenstrahlung, toxische Substanzen und ultraviolettes Licht lösen ebenfalls die Bildung aktivierter Sauerstoffmoleküle aus.

Die Bildung freier Radikale ist demnach eine physiologische Gegebenheit im menschlichen Organismus. Allerdings kann sie unter bestimmten Umständen pathologische Ausmaße annehmen (Biesalski et al. 1995).

Freie Radikale zeichnen sich durch eine sehr hohe Reaktionsbereitschaft aus. Sie reagieren sehr leicht mit anderen Substanzen und führen dadurch zur Bildung neuer Radikale. Auch die zellulären und extrazellulären Strukturen des menschlichen Organismus sind diesen Angriffen ausgesetzt. Freie Radikale können Membran-Lipide und –Proteine angreifen und einen auto-katalytischen Prozeß („free radical chain reaction“) initiieren, der dazu führt, daß die Lipide zu Hydroperoxiden oxidieren. Besonders empfindlich gegenüber Peroxidationen sind mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFA) (Gutteridge et al. 1994). Da die PUFA der Bio-Membran einen entscheidenden Einfluß auf die Fluidität und Funktionalität der Membran haben, führt ein Verlust dieser Fettsäuren zu irreparablen Membran-Schäden. Kettenreaktionen wie bei der Lipidperoxidation können auch Proteine, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren schädigen.

1.2.2 Das Gehirn als Angriffsziel freier Radikale

Den Angriffen freier Radikale und seiner Produkte (reactive oxygen species, ROS) sind die Zellstrukturen aller Organsysteme des Menschen ausgesetzt. Jedoch gilt das zentrale Nervensystem (ZNS) als besonders betroffen. Neurone scheinen gegenüber oxidativem Streß besonders anfällig zu sein, aufgrund einiger ungünstiger Besonderheiten in der antioxidativen Abwehr bzw. aufgrund der höheren oxidativen Belastung:

- Neurone besitzen eine extrem lange Lebensdauer
- Neurone besitzen einen niedrigen Gehalt an Glutathion, einem wichtigen zellulärem Antioxidans, verantwortlich für die Beseitigung zytosolischer Peroxide (Smith et al. 1995)
- Die neuronale Membran besitzt einen hohen Gehalt an PUFA, die sehr empfindlich gegenüber Lipidperoxidationen bzw. oxidativem Streß sind
- Verglichen mit anderen zellulären Proteinen haben Neurofilamente und cytoskeletale Proteine wie z.B. das τ -Protein einen hohen Gehalt an Lysin-Resten. Zudem besitzen sie relativ lange Halbwertszeiten. Das macht sie sehr empfindlich für eine kumulative oxidative Schädigung durch ROS bzw. Produkte von Lipidperoxidation, z.B. 4-Hydroxy-Alkenal (4-HNE).

- Das Gehirn zeichnet sich durch einen sehr hohen absoluten und prozentualen Sauerstoffverbrauch aus und ist daher in besonderem Maße ROS ausgesetzt

Die Anfälligkeit des ZNS gegenüber freien Radikalen läßt einen Zusammenhang zwischen der AD und oxidativem Streß als plausibel erscheinen. Tatsächlich gibt es eine Fülle von wissenschaftlichen Studien, die oxidativen Streß als pathogenetisches Prinzip bei der AD nahelegen. Charakteristische Schädigungsmuster, reproduzierbare Quellen oxidativen Streß sowie Veränderungen im neuronalen antioxidativen Abwehrsystem geben dabei klare Anhaltspunkte.

1.2.3 Spurenelemente als Quelle von oxidativem Stress bei AD

Die Theorie von der neurotoxischen Wirkung bestimmter Spurenelemente unterstützt die grundsätzliche These vom Zusammenhang zwischen AD und oxidativem Stress. Besondere Aufmerksamkeit gilt hier den Elementen Eisen (Fe), Aluminium (Al) und Kupfer (Cu).

Fe wird in diesem Kontext die wichtigste pathophysiologische Rolle bei der Hervorbringung freier Radikale zugewiesen, aufgrund seiner physiko-chemischen Eigenschaften (ein nur locker gebundenes Elektron in der äußeren Elektronenhülle, die Fähigkeit, in mehreren Valenzen zu existieren – Fe^{2+} und Fe^{3+} , die Fähigkeit von Fe^{2+} , ein Elektron zu übertragen und somit die Bildung freier Radikale zu ermöglichen) (Markesbery 1997).



Eine Reihe von Studien weisen auf eine Störung des Eisenstoffwechsels bei AD-Patienten hin (Ehmann et al. 1986; Goodman et al. 1953). Beispiele sind die signifikanten Erhöhungen der Fe-Spiegel in Amygdala, Hippocampus und Olfaktorischer Leitungsbahnen bei AD-Patienten verglichen mit altersgleichen Kontroll-Personen (Thompson et al. 1988), die erhöhten Fe-Werte in NFT-tragenden Neuronen verglichen mit NFT-freien Neuronen bei der AD und der erhöhte Fe-Gehalt von Ferritin im Nerven-Gewebe von AD-Patienten (Flemming et al. 1987).

Cu ist ebenfalls in der Lage, die Bildung freier Radikale zu katalysieren. Mehrere Studienergebnisse legen einen Zusammenhang des Cu-Stoffwechsels und der AD nahe (Markesbery 1997).

1.2.4 Lipidperoxidation

Phospholipide besitzen eine Vielzahl von vitalen Membranfunktionen. Phospholipide enthalten reichlich PUFA. PUFA (zu denen u.a. Arachidonsäure und Docosahexenoic Säure gehören) sind aufgrund zahlreicher Doppelbindungen sehr empfindlich gegenüber Angriffen freier Radikale (Markesbery 1997). Es kommt zur Bildung von Lipidperoxiden mit der Folge verminderter Membranfluidität und partiellem bis totalem Funktionsverlust.

Folgen verminderter Fluidität und der erhöhten Permeabilität sind unter anderem pathologische Ionen-Flüsse, die zur Destabilisierung des Cytoskeletts und zu weiteren peroxidativen Prozessen führen können mit der Konsequenz langsamer Neuronendegeneration bzw. neuritischen Veränderungen (Smith et al. 1995).

Der Gehalt an PUFA ist im Gewebe des ZNS sehr hoch. Daher stellt sich die Frage nach dem möglichen Zusammenhang von AD und oxidativen Veränderungen im Phospholipid-Metabolismus des Gehirns.

Tatsächlich zeigen verschiedene Studien einen Anstieg der Lipidperoxidationen im Gehirn von AD-Patienten. Lovell et al. (1995) verwendeten die Spiegel an Thiobarbituric-Säure-reaktiven Substanzen (TBARS) als Parameter für Lipid-Peroxidationen (in Anlehnung an die Methode von Subbarao et al.(1990)) und zeigten einen signifikanten Anstieg an TBARS in verschiedenen Cortex-Regionen in post mortem Gewebe von AD Patienten (Amygdala, Hippocampus und parahippocampaler Gyrus, pyriformer Gyrus) (Lovell et al. 1995). Mehrere in vitro Studien zeigen einen Anstieg von Lipidperoxidation in Hirn-Proben von AD-Erkrankten nach Stimulation mit Fe-Ascorbat bzw. Fe-H₂O₂ (zitiert nach Markesbery 1997). Eine verminderte Fluidität der mitochondrialen Membran und ein Anstieg an oxidierten Nukleotiden in mitochondrialer DNS, gefunden in Hirngewebe von AD-Patienten, deuten ebenso auf einen oxidativ bedingten Schaden dieser Organelle hin (Sims et al. 1996).

Lipidperoxidation führt zur Bildung großer Mengen an Aldehyden, besonders von 4-HNE, das bei der Oxidation von PUFA entsteht. 4-HNE ist ein sehr reaktives Molekül und für zytotoxische Schäden verantwortlich, die bei oxidativem Stress auftreten (Esterbauer et al. 1991). Die toxische Wirkung von 4-HNE auf Neuronen und Astrozyten ist mehrfach nachgewiesen worden. Es gibt Hinweise auf einen erhöhten Spiegel an 4-HNE in postmortem CSF von AD-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Gruppen (Markesbery 1997). In frischem Liquor wurden

die Oxidationsstudien von Schippling et al. (1999) und Arlt et al. (1999) durchgeführt, die erhöhte Lipidperoxidationen und erniedrigte Antioxidantien zeigen konnten.

1.2.5 DNS Oxidation in AD

Freie Radikale führen zu z.T. charakteristischen Veränderungen des genetischen Codes. Ein häufig verwendeter Marker für durch freie Radikale induzierte DNS-Veränderungen ist 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine (8OH-dG). In Rattengewebe wurde bereits ein Anstieg von 8OH-dG durch Alterungsprozesse nachgewiesen (Bowling et al. 1995). In einer Studie mit AD-Patienten wurde ein Anstieg der oxidativen Schädigung des Gehirns im Vergleich zu Kontroll-Personen mithilfe einer erhöhten Konzentration an mitochondrialer 8OH-dG im parietalen Kortex der Erkrankten manifestiert (Mecocci et al. 1994). Diese Studien deuten auf einen signifikanten Anstieg an oxidativer Schädigung der DNS bei AD-Patienten hin.

1.2.6 Protein-Modifikation, A β und AGE

Natürlich sind auch Proteine den Angriffen freier Radikale ausgesetzt. Zu den durch Sauerstoffradikale verursachten Veränderungen der Protein-Struktur, die bei der AD gefunden werden gehören Phosphorylierungen, Isomerisierungen, Fragmentierungen und vor allem cross-linking-Reaktionen (Smith et al. 1995). Folgen dieser Modifizierungen sind unter anderem verminderte Protein-Löslichkeit und verstärkte Resistenz gegenüber Proteasen.

Ein zentrales Element in der Pathogenese der AD ist die verminderte Löslichkeit spezifischer zellulärer Proteine mit der folgenden Bildung seniler Plaques. Eine oxidativ herbeigeführte Veränderung im Protein-Stoffwechsel wird hierfür verantwortlich gemacht.

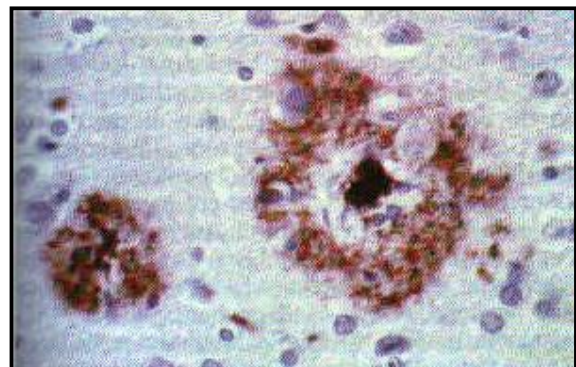


Abbildung 4: neuritische Plaques;
immunhistochemische Darstellung mit A β -
Antikörpern (Kleihues et al. 1997, S. 291)

Eine Reihe von Studien deutet darauf hin, daß Glykierung von Proteinen eine wichtige Rolle bei AD spielt. Advanced glycation end products (AGE) sind posttranslationale Modifikationen, die bei der Kondensation von reduzierenden Zuckerresten mit freien Amino-Gruppen

von Proteinen in der Maillard Reaktion entstehen (Monnier et al. 1981). Sauerstoff bzw. oxidativer Stress fördert die Bildung von AGE. AGEs werden daher als Marker für kumulative Protein-Schädigung durch Glykierung angesehen (zitiert nach Takeda et al. 1996).

AGE wurde bereits verantwortlich gemacht für pathologische Vorgänge beim Diabetes mellitus und physiologischen Alterungsprozessen (Smith et al. 1995). Mittlerweile schreibt man AGE auch eine wichtige Rolle bei der AD zu, insbesondere beim Entstehen der NFT und senilen Plaques (Smith et al. 1996).

A β und τ -Protein sind die hauptsächlichen (proteinhaltigen) Bestandteile der NFTs und senilen Plaques. Unter physiologischen Bedingungen sind beide Proteine löslich und dem Abbau durch Proteasen unterworfen. Im Rahmen der AD liegen sie jedoch als unlösliche und Protease-resistente Bestandteile der NFTs und senilen Plaques vor. Crosslinking-Modifizierungen durch AGE wird inzwischen als Grund für diese Veränderungen angeführt (Smith et al. 1995; Smith et al. 1996; Butterfield 1996; Markesbery 1997).

A β ist ein 40-43 Aminosäuren langes Peptid, welches in den neuritischen Plaques in hohen Konzentrationen zu finden ist. A β wurde mittlerweile als direkt toxisch gegenüber Nervenzell-Kulturen nachgewiesen (Behl et al. 1994), wahrscheinlich aufgrund der Bildung freier Radikale. Da Mutationen im APP, die zu einer Überproduktion von A β -1-42 führten, bei Fällen familiärer AD Erkrankung gefunden wurden, wird A β mancherorts eine zentrale Rolle in der Pathogenese der AD zugeschrieben.

Neben den Protein-modifizierenden Fähigkeiten besitzen AGE auch direkte prooxidative Wirkungen mit Bildung freier Sauerstoffradikale (Münch et al. 1996). Da auch A β und den senilen Plaques selbst eine Rolle bei der Entstehung von ROS zugeschrieben wird (Butterfield 1996), scheint hier ein Kreislauf sich gegenseitig fördernder neurodegenerativer Prozesse manifest zu sein.

1.2.7 Exzitotoxizität

Sowohl der eingeschränkte Energie-Metabolismus als auch direkter oxidativer Schaden haben wichtige Interaktionen mit Exzitotoxizität und tragen somit zum Zelluntergang im Nervengewebe bei. So spielen freie Radikale eine wichtige Rolle bei der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) - und nicht-NMDA-Rezeptor-vermittelten Exzitotoxizität. NMDA-Rezeptor-Aktivierung wurde mit der Bildung von Superoxiden in Verbindung gebracht. Außerdem zeigen Studien einen Zusammenhang von freien Radikalen und erhöhter Freisetzung bzw. verminderter Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren (Bowling et al. 1995).

1.2.8 Fazit

Die angeführten Beispiele verdeutlichen die auf den unterschiedlichen Ebenen der Zellstruktur gefundenen Indizien für oxidativ bedingte Schäden. Diese reichen von der äußeren Hülle (der Lipid-Doppelmembran) bis zum innersten Kern der Zelle, der DNS. Die Ursachen für die pathologisch gesteigerte oxidative Schädigung der neuronalen Strukturen bleibt jedoch nur unzureichend geklärt.

Neben anderen noch unentdeckten Faktoren könnte ein Ungleichgewicht im Verhältnis von oxidativem Streß einerseits und antioxidativer Abwehr andererseits die Pathogenese erklären. Vor dem Hintergrund der beschriebenen protektiven Potentiale der verschiedenen Antioxidanzien wäre ein Mangel eben dieser Antioxidanzien möglicherweise ein pathogenetischer Faktor. In der Tat gibt es Hinweise auf Veränderungen verschiedener oxidativer Parameter bei an AD erkrankten Menschen.

1.3 Das antioxidative Abwehrsystem des Körpers

Der menschliche Körper besitzt ein komplex aufgebautes Abwehrsystem, um dem Wirken der freien Radikale nicht schutzlos ausgeliefert zu sein. Zentrale Säule dieser Abwehr sind eine Vielzahl verschiedener antioxidativ wirkender Substanzen.

Entsprechend ihrem Wirkmechanismus können diese Antioxidantien grob in zwei Gruppen unterteilt werden, in sog. präventive Antioxidantien und Kettenabbruchantioxidantien (Nicki 1987).

Präventive Antioxidantien reduzieren das Ausmaß der Bildung freier Radikale bzw. von Radikal-Kettenreaktionen, indem sie die auslösenden Radikale neutralisieren. Dies kann beispielsweise durch Komplexierung geschehen. Die Chelatoren und metallbindende Proteine wie Transferrin und Ceruloplasmin gehören zu dieser Gruppe der präventiven Antioxidantien.

Kettenabbruchantioxidantien („chain-breaking“-Antioxidantien) greifen zu einem späteren Zeitpunkt der Radikalkette ein. Ihre antioxidative Wirkung entfaltet sich dadurch, daß sie bereits entstandene radikalische Zwischenprodukte einfangen und durch die Bildung reaktions-träger Produkte die Reaktionskette unterbrechen.

Die Abwehrmechanismen gegen die beschriebenen Arten von oxidativem Stress erstrecken sich auf verschiedene Kompartimente:

- die Zelle
- die Membran (Lipid-Doppelschicht)
- die extrazellulären Flüssigkeiten (Blut-Plasma, Lymphe, Cerebrospinal-Flüssigkeit, Synovial-Flüssigkeit etc...) mit wäßriger und lipophiler Phase.

Die intrazellulären antioxidativen Abwehrmechanismen beruhen vor allem auf enzymatischen Systemen, allen voran Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase, Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) und Glutathion-Reduktase (Stocker et al. 1991; Halliwell et al. 1989).

Dem Schutz der Zellmembran dienen die lipophilen Antioxidantien, die Tocopherole, Karotine und Ubichinol-10.

Die extrazellulären Flüssigkeiten des Körpers wie Blut-Plasma und CSF enthalten nur geringe Mengen oder keine Katalase und niedrige Konzentrationen an SOD und GSH-Px (Hunter et al. 1985; Krinsky 1992). Zu den wichtigsten Antioxidantien im Blut-Plasma gehören das Cu-bindende Ceruloplasmin, Albumin, das Fe-bindende Transferrin und Hämoglobin (Stocks et al. 1974; Gutteridge 1978; Halliwell et al. 1986).

Trotz des offensichtlichen Mangels an enzymatischen Abwehrsystemen besitzt das Blut-Plasma neben den genannten Komponenten noch eine Reihe weiterer sehr effizienter Antioxidantien, die sozusagen als „second line“-Antioxidantien dann wichtig werden, wenn die bereits genannten Abwehrsysteme aufgrund starker Beanspruchung ausgelastet sind. Zu diesen „second line“-Antioxidantien zählen die wasserlöslichen, also Harnsäure, Ascorbat und Bilirubin sowie die lipidlöslichen Tocopherole und Ubichinole (Esterbauer et al. 1992; Wayner et al. 1987).

Tabelle 1: Die verschiedenen Kompartimente des antioxidativen Systems

intrazellulär	Lipidmembran	extrazellulär
Superoxiddismutase Katalase Glutathionperoxidase reduziertes Glutathion Zystein	Tocopherole Karotine Ubichinol-10	Albumin Transferrin Caeruloplasmin Haptoglobin Ascorbat Urat Bilirubin

1.3.1 Wasser-lösliche Antioxidantien

Ascorbat – Vitamin C

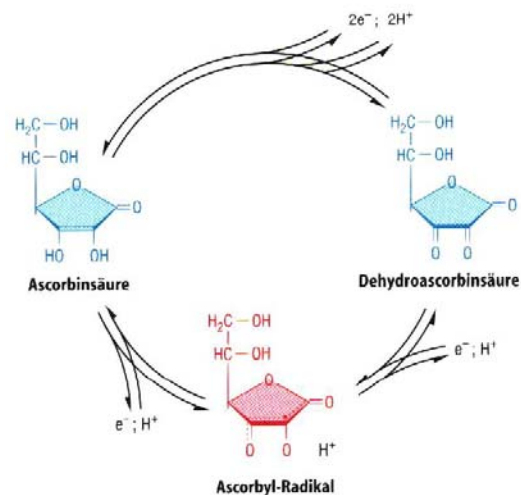
Biochemie – Wirkungsmechanismus

Die Bedeutung des Vitamin C im menschlichen Organismus liegt vor allem in seiner Rolle als essentieller Kofaktor von Hydroxylierungsreaktionen, z.B. bei der Biosynthese des quervernetzten Kollagenmoleküls, der Bildung von Steroid-Hormonen und Neurotransmittern. Ein starkes Reduktions-potential trägt zu dieser Funktion des Vitamin C bei.

Dieses Reduktionspotential ist auch die molekulare Grundlage dafür, daß Ascorbat ein sehr wichtiges Antioxidans der wässrigen Phase extrazellulärer Flüssigkeiten ist. Sein antioxidatives Potential erstreckt sich auf eine Vielzahl von Oxidantien.

Die Oxidation von Ascorbat zu Dehydroascorbat verläuft über die intermediär entstehende radikale Semidehydro-Ascorbinsäure. Diese drei chemischen Formen des Vitamin C stellen ein reversibles Redoxsystem dar.

Das entstandene Dehydroascorbat ist instabil. Wird es nicht erneut zur Ascorbinsäure reduziert, hydrolysiert es rasch zu Diketogulonischer Säure.

**Abbildung 5: Ascorbat als Redoxsystem**

(Löffler et al. 1997, S. 663)

Protektive Wirkungen

Ascorbat besitzt ein breites Spektrum antioxidativer Fähigkeiten. Zu ihnen gehören:

- Das Einfangen von Superoxid Radikalen ($O_2^{\cdot-}$).
- Das Einfangen von Singulett Sauerstoff und Hydroxy-Radikalen ($\cdot OH$).
- Die Regeneration / Reduktion von α -Tocopherol-Radikalen zu α -Tocopherol in Bio-Membranen.

Zusammen mit Urat (s.u.) ist Ascorbat ein sehr wichtiges Antioxidans der extrazellulären Flüssigkeiten. Trotz seines hydrophilen Charakters ist es in der Lage, Lipoproteine und Biomembranen vor peroxidativem Schaden zu schützen. Ascorbat fängt freie Radikale in der wässrigen Phase ab, noch bevor diese Lipide attackieren können. Daneben besteht ein effizienter Synergismus mit α -Tocopherol zum Schutz der Doppel-Lipid-Membran (s.u.).

Nach Ansicht von Lönnrot et al. (1996) gehört Ascorbat im Plasma neben Ceruloplasmin, Albumin, Transferrin, Urat und Hämoglobin nur zur „second line“ des antioxidativen Systems. Frei et al. (1989) sehen in Ascorbat dagegen das bedeutendste Antioxidans des Blutplasmas. Ihrer Ansicht nach ist Ascorbat das einzige Antioxidans, das in der Lage ist, Lipide vollständig vor oxidativem Schaden durch Peroxyl-Radikale der wässrigen Phase zu schützen. In diesem Vermögen zeige sich Ascorbat weit effektiver als α -Tocopherol, Protein-SH-Gruppen, Bilirubin oder Urat. Auch Stocker (1994) betont die zentrale Rolle von Vitamin C als hydrophiles Antioxidans, vor allem als Co-Antioxidans im Rahmen seines Modells der Tocopherol-vermittelten Peroxidation (Tocopherol-mediated-peroxidation, TMP).

Sicher ist, daß Ascorbat im Liquor eine herausragende Bedeutung besitzt. Mehrere Umstände tragen zu der zentralen Rolle von Ascorbat als Antioxidans der CSF bei:

1. Anders als das Plasma enthält der Liquor nur sehr geringe Mengen an metallbindenden Proteinen wie Transferrin und Ceruloplasmin sowie an SH-Gruppen-reichem Albumin. Die CSF zeichnet sich zudem durch eine auffällige Armut an lipophilen Antioxidantien aus. Sowohl die Konzentration von α -Tocopherol als auch die von Ubichinon sind im Liquor wesentlich niedriger als im Plasma.
2. Die Konzentration von Ascorbat ist im Liquor im Vergleich zu der im Plasma um ein Vielfaches erhöht (20-60 μM im Plasma vs. 300-400 μM im Liquor) (Abuja 1999). Ein

für Ascorbat spezifisches aktives Transportsystem im Plexus choroideus sorgt für die konstant hohen Ascorbat-Konzentrationen im Liquor (Lönnrot et al. 1996).

Ein Beleg der zentralen Rolle von Ascorbat für die antioxidative Abwehr der CSF sind die Beobachtungen von Lönnrot et al. (1996). Ascorbat erwies sich dabei als maßgeblicher Faktor der antioxidativen Kapazität (total (peroxyl) radical-trapping antioxidant parameter, kurz TRAP) des Liquors. In einer Untersuchung der Auswirkungen von Ascorbat- und Ubichinon-Supplementation auf die antioxidative Kapazität (TRAP) von Plasma und Liquor zeigte sich ein gemeinsamer Anstieg von Ascorbat und TRAP in der CSF.

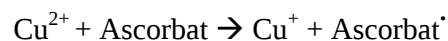
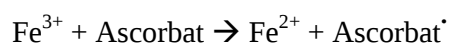
Neben den antioxidativen Aufgaben übt Ascorbat im ZNS wahrscheinlich noch neuromodulatorische Funktionen aus, indem es in den Neurotransmitter- und Rezeptor-Stoffwechsel von Dopamin, Katecholaminen und NMDA-Rezeptoren eingreift.

Antioxidative vs. Prooxidative Wirkungen

Die einzelnen Antioxidantien stehen untereinander in einem komplexen funktionellen Beziehungsgeflecht. Diese Wechselwirkungen bestimmen den individuellen Beitrag jedes einzelnen Antioxidans. So unterliegt auch die Funktion von Ascorbat als Antioxidans den regulierenden Einflüssen anderer Antioxidantien.

Es liegt in der Natur bzw. den biochemischen Eigenschaften der Antioxidantien begründet, daß sie selbst dem Prozeß der Autooxidation gegenüber empfindlich sind. Dies gilt auch für Vitamin C.

Unter experimentellen Bedingungen konnte bereits mehrfach gezeigt werden, daß Ascorbat auch prooxidative Wirkung besitzen kann (Sevanian et al. 1991; Stocker et al. 1991; Gutteridge et al. 1994). Neben steigendem Sauerstoff-Partialdruck führen vor allem Übergangsmetalle wie Cu und Fe zu stark ansteigenden Autooxidationsraten von Ascorbat. Die Fähigkeit des Ascorbat, als biologisches Reduktionsmittel zu agieren, trägt offensichtlich nicht nur zum antioxidativen Potential dieser Substanz bei, sondern führt auch zu dem Vermögen, selbst Reaktionen freier Radikale zu katalysieren. Als ein Beispiel sei die Reduktion von Fe^{3+} bzw. von Cu^{2+} durch Ascorbat genannt:



Bei dieser Autooxidation entstehen die sehr reaktionsfähigen Produkte $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . In Anwesenheit Redox-labiler Metalle wie Cu und Fe ist daher eine ausgeprägte Instabilität und ein prooxidatives Verhalten von Ascorbat zu beobachten. Im Beisein bestimmter Chelatoren kann Ascorbat jedoch recht stabil sein (Sevanian et al. 1991).

Mehrere Faktoren führen dazu, daß Ascorbat unter physiologischen Bedingungen nicht als Pro- sondern als Antioxidans wirkt:

1. Abgesehen von seltenen pathologischen Zuständen sind im menschlichen Plasma keine meßbaren Mengen an freien Übergangsmetallen zu finden. Cu und Fe sind vielmehr an spezifische Bindungsproteine gebunden. Im Plasma gesunder Menschen beträgt die Sättigungsrate von Transferrin, dem Bindungsprotein von Fe, lediglich 20-30% und die Konzentration an freiem Fe praktisch 0%. Transferrin-gebundenens Fe kann nicht an Radikalen-Reaktionen teilnehmen. Cu ist ebenfalls sicher an Proteine, v.a. Ceruloplasmin gebunden.
2. Urat, selbst ein wichtiges hydrophiles Antioxidans, stabilisiert Ascorbat in biologischen Flüssigkeiten. Sevanian et al. (1991) führten die Ascorbat schützende Wirkung darauf zurück, daß Urat einerseits durch Komplexierung von Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Molekülen die Fe-katalysierte Autooxidation verhindert. Zusätzlich wird Ascorbat durch Wasserstoff-Brückenbindungen stabilisiert und pH-abhängige Autooxidationen werden unterbunden. Neuere Studien zeigen, daß Ascorbat selbst wiederum prooxidative Effekte von Urat bei der Oxidation von LDL-Partikeln verhindert.

Zusammenfassend ist also festzuhalten, daß Vitamin C als Antioxidans der wäßrigen Phase insbesondere im Liquor eine wichtige Rolle in der antioxidativen Abwehr des zentralen Nervensystems einnimmt und daß unter physiologischen Bedingungen die potentiell prooxidativen Potentiale von Ascorbat durch Interaktionen mit anderen Antioxidantien unterbunden werden.

Harnsäure

Harnsäure ist, wie bereits erwähnt, ebenfalls als ein wichtiges wasserlösliches Antioxidans anzusehen. Es entsteht als Endprodukt des Purin-Metabolismus und wird über den Harn ausgeschieden. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Urat-Konzentration im Plasma

155 – 387 $\mu\text{mol/l}$ (Classen et al. 1993). Urat entfaltet seine antioxidative Wirkung auf mehrere Weisen. Urat besitzt die Fähigkeit, Sauerstoffradikale in der wäßrigen Phase abzufangen und wirkt somit als präventives Antioxidans zum Schutz von Lipoproteinen und Membranen. Zudem wirkt es indirekt antioxidativ. Urat besitzt die Fähigkeit, freie Übergangsmetalle zu komplexieren. Durch diesen Mechanismus und die Fähigkeit, mit Ascorbat Wasserstoff-Brückenbindungen einzugehen, stabilisiert Harnsäure bei physiologischen Konzentrationen Ascorbat im Blut-Plasma (Sevanian et al. 1985). Neben den erwähnten antioxidativen Funktionen wurden noch weitere protektive Aktivitäten von Urat beschrieben. So soll Urat Erythrocyten vor Peroxid-induzierter Lysis schützen sowie Nukleotide vor der Oxidation durch Ozon (Becker 1993).

Faktoren, die die Bedeutung von Urat als Antioxidans stützen, sind einerseits die im Vergleich zu anderen Antioxidantien wie Ascorbat und α -Tocopherol hohen Konzentrationen im Plasma, andererseits die Tatsache, daß Urat in allen extrazellulären Flüssigkeiten zu finden ist (Becker 1993). In den Untersuchungen von Lönnrot et al. (1996) war Urat sogar der hauptsächliche Bestandteil von TRAP im Plasma. Aufgrund des hydrophilen Charakters des Moleküls ist Urat gegenüber Radikalen, die in der Lipidphase entstehen, dagegen wirkungslos.

Die Ergebnisse von Abuja (1999) zeigen, daß auch Urat unter bestimmten Umständen prooxidative Wirkung entfalten kann (v.a. in Abwesenheit von α -Tocopherol und Ascorbat).

Bilirubin

Auch Bilirubin besitzt antioxidative Kapazitäten (Stocker et al. 1987). Bilirubin entsteht als Abbau-Produkt des Hämoglobin-Stoffwechsels. Die Bilirubin-Gesamtkonzentration im Plasma beträgt 3,4 – 18,8 μM (Classen et al. 1993). Vor der Glucuronierung in den Hepatozyten ist Bilirubin schwer wasserlöslich und an Albumin gebunden.

Bilirubin besitzt die Fähigkeit, Sauerstoffradikale abzufangen. Zudem schützt Bilirubin u.a. Albumin-gebundene ungesättigte Fettsäuren (z.B. Linoleic-Säure) vor Peroxyl Radikal-induzierter Oxidation (Stocker et al. 1987). Stocker et al. (1987) berichten über eine Abhängigkeit der antioxidativen Aktivität des Bilirubins vom Sauerstoff-Partialdruck. Demzufolge nimmt die antioxidative Potenz mit steigendem Sauerstoff-Partialdruck ab, die Rate der Autooxidation jedoch zu.

Albumin

Human Albumin, das prominenteste der Plasma-Proteine, hat spezifische Bindungs-Orte für eine Reihe von Liganden, u.a. Fettsäuren und Kupfer. Somit besitzt es die Fähigkeit, freie Übergangsmetalle durch Komplexbildung zu binden. Mit seinen zahlreichen SH-Gruppen kann es zudem Peroxyl-Radikale einfangen (Stocks et al. 1974). Ein Großteil der Protein-assoziierten Thiol-Gruppen befindet sich im Plasma an Albumin gebunden (Radi et al. 1991). Da Albumin in sehr hoher Konzentration im Plasma vorliegt und eine relativ kurze Halbwertszeit von ca. 20 Tagen besitzt, führt die Oxidation der Thiol-Gruppen des Albumins nicht zu signifikanten biologischen Konsequenzen (Stocker et al. 1991). Albumin agiert somit als Antioxidans des Plasma und der extrazellulären Kompartimente und bietet Schutz vor Cu- und Häm-katalysierten Oxidations-Prozessen (Gutteridge 1983; Gutteridge et al. 1988; Vincent et al. 1988; Halliwell 1988).

Abbildung 6: Tocopherol

(Löffler et al. 1997, S. 660)

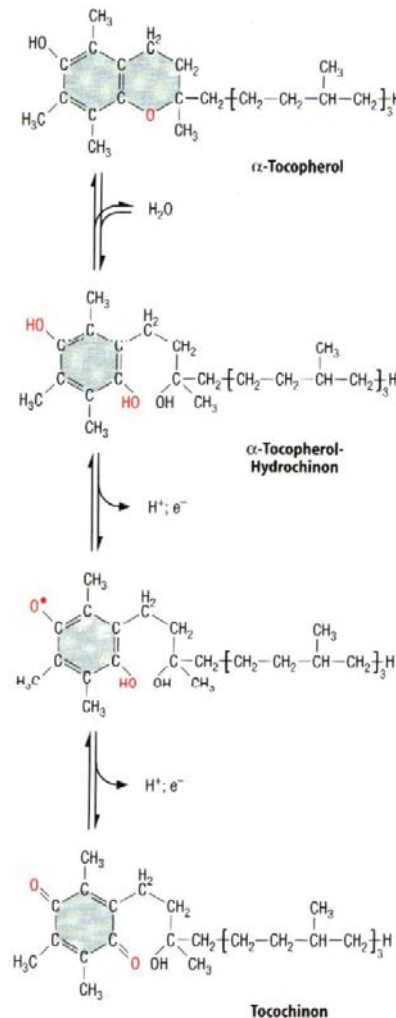
1.3.2 Lipophile Antioxidantien

Tocopherol – Vitamin E

Biochemie – Wirkmechanismus

Die Tocopherole (Vitamin E) gehören zu den lipophilen Vitaminen. Sie setzen sich aus einem Chromanring und einer isoprenoiden Seitenkette zusammen. Für die Vitaminwirkung sind der Chromanring und das Vorhandensein mindestens einer Methylgruppe und der Hydroxylgruppe am Ring von Bedeutung.

Aufgrund der Stellung der Methylgruppen am Chromanring unterscheidet man α -, β -, γ - und δ -Tocopherole. A-Tocopherol ist die biologisch aktivste Vitamin-E-Form in Plasma und CSF.



Die anderen Tocopherole sind beim Menschen weniger bedeutsam. Zwar können sie ebenso wie α -Tocopherol antioxidativ wirken, jedoch werden sie weniger effektiv im Darm resorbiert und gleichzeitig schlechter im Körpergewebe zurückgehalten (Gutteridge et al. 1994). Neben der deutlich höheren Konzentration von α -Tocopherol gegenüber γ -Tocopherol, beträgt die biologische Aktivität von γ -Toc zudem nur 10% von der des α -Tocopherol (Vatassery et al. 1991).

Tocopherole können in Tocochinone umgewandelt werden und in dieser Form an Redoxreaktionen teilnehmen. Von besonderer Bedeutung ist, daß Tocopherole in 1-Elektronenreaktionen mit organischen Peroxylradikalen reagieren können.

Stoffwechsel der Tocopherole

Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin E wird zusammen mit den Fetten unter der Einwirkung von Galle und Pankreasfermenten im Dünndarm resorbiert. In Chylomikronen gebunden gelangt es zur Leber. Die Leber bindet Vitamin E in Lipoproteine (Very low density lipoproteins, VLDL) ein und gibt sie ans Blut ab. Das so an VLDL gebundene Vitamin-E bestimmt im wesentlichen die Plasmakonzentration von 12-48 $\mu\text{mol/l}$.

A-Tocopherol ist reichlich im ZNS vorhanden (Toghi et al. 1994). Dagegen enthält die CSF nur sehr geringe Konzentrationen an Tocopherolen.

Protektive Wirkungen

A-Tocopherol ist Bestandteil aller Membranen tierischer Zellen. Seine wichtigste Funktion ist die eines lipidlöslichen Antioxidans (Stocker et al. 1991). Als „chain-breaking“ Antioxidans fängt es freie Radikale ein und beendet so die „free radical chain reaction“ (Toghi et al. 1994). In der Lipid-Doppelmembran ist α -Tocopherol mit seiner lipophilen Phytanyl-Kette verankert. Der Chromanring mit seiner OH-Gruppe zeigt zur Außenfläche der Membran. Durch die Übertragung seines phenolischen Wasserstoff-Atom auf Lipid-Peroxyl-Radikale können Radikale der Lipid-Phase eingefangen werden. Die hierbei entstehenden beiden Moleküle sind wenig reaktiv.



A-Tocopherol reagiert mit den Peroxyl-Radikalen sehr viel schneller als diese mit den Membran-Proteinen bzw. -Lipiden und unterbricht so den autokatalytischen Prozeß. Zu den protektiven Wirkungen des α -Tocopherols gehört der Schutz von Membranlipiden, ungesättigten Fettsäuren, Lipoproteinen und Depotfetten vor Zerstörung durch Lipidperoxydationsprozessen.

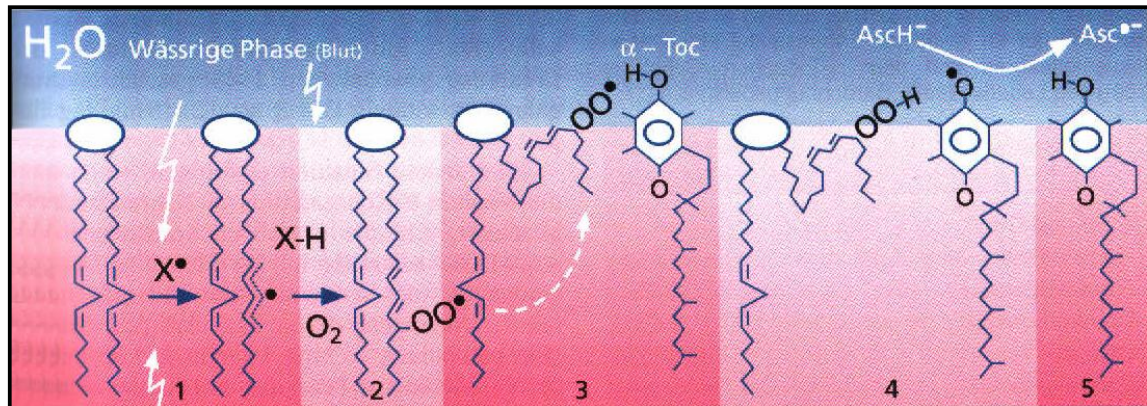


Abbildung 7: Kettenreaktion bei Lipidperoxidation (Biesalski et al. 1995, S. 113)
Rolle der Antioxidantien α -Tocopherol und Ascorbat

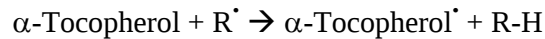
1. Initiierung, zum Beispiel durch Superoxidanionen oder Singuletsauerstoff
2. Addition von molekularem O_2 mit Bildung eines aggressiven Peroxyl-Radikals $-OO^\bullet$ (PR). Wird diese Reaktion nicht unterbrochen, so generiert das PR ein neues PR. Dadurch wird eine Kettenreaktion eingeleitet, die sich so lange über die Membran ausbreitet, bis zum Beispiel ein kettenbrechendes Antioxidans wie
3. α -Tocopherol die Reaktion unterbricht
4. α -Tocopherol wird dabei selbst zum Radikal, reagiert aber kaum mit benachbarten Fettsäuren.

Der Vitamin E-Gehalt von Bio-Membranen bestimmt häufig die Anfälligkeit von mikrosomalen Membranen, LDL-Partikeln, Hepatocyten oder ganzen Organen gegenüber der Schädigung durch peroxidierende Moleküle wie z.B. $^{\bullet}OH$ -Radikale, Alkoxy-Radikale, Peroxyl-Radikale und eine Reihe von Sauerstoff-Metall-Komplexen (Mascio et al. 1991).

Regeneration

Wie bereits erwähnt entstehen bei der Reaktion von α -Tocopherol mit Lipidperoxylen α -Tocopherol-Radikale (α -Tocopherol $^\bullet$). Das Schicksal der entstehenden α -Tocopherol-Radikale hängt von den jeweiligen biochemischen Begleitumständen ab, u.a. vom Ausmaß an oxidativem Streß und dem Vorhandensein von recyclenden Molekülen. Um seine antioxidative Aktivität wirkungsvoll entfalten zu können, müssen diese α -Tocopherol-Radikale effizient abgebaut werden. Dies kann auf unterschiedliche Weisen geschehen.

1. Nachdem ein freies Radikal ($R^\cdot$) durch ein α -Tocopherol Molekül inaktiviert wurde

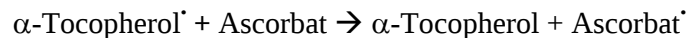


reagiert das entstandene α -Tocopherol-Radikal sofort erneut mit einem freien Radikal



Daraus resultiert die Inaktivierung zweier freier Radikale durch ein einziges Molekül α -Tocopherol. Dieser Mechanismus ist vor allem bei relativ starken oxidativen Bedingungen vorherrschend.

2. Ein zweiter unter physiologischen Bedingungen bedeutsamer Weg ist das Recycling der entstehenden α -Tocopherol-Radikale mithilfe einer Reihe sog. α -Tocopherol Co-Antioxidantien. Zu den wichtigsten Regeneratoren des α -Tocopherol zählen Ascorbat und Bilirubin, zumal sie in hohen Konzentrationen im Plasma und (zumindest Ascorbat) Liquor zu finden sind (Kontush et al. 1996):



Da α -Tocopherol als membranständiges Molekül primäres lipophiles Antioxidans ist, während sich die Aktivität von Ascorbat auf die wässrige Phase beschränkt, haben Waters et al. (1997) folgende Synergismus-Theorie zwischen diesen beiden Vitaminen aufgestellt:

α -Tocopherol fängt lipid-gebundene Peroxyl-Radikale innerhalb der Lipid-Doppelmembran ein. Anschließend diffundiert das entstandene α -Tocopherol-Radikal an die Interphasengrenze, wo es durch Ascorbat aus der wässrigen Phase recycled wird.

Antioxidative vs. prooxidative Wirkung

Die beschriebene Interaktion von Vitamin E und Ascorbat spielt auch eine wichtige modulierende Rolle für die prooxidative Wirkung von α -Tocopherol. Wie bereits erwähnt unterliegen Antioxidantien der Autooxidation. Untersucht ist dieses Phänomen für Ascorbat, α -Tocopherol, Bilirubin und GSH (zitiert nach Stocker et al. 1991).

Eine differenzierte Betrachtung des komplexen Wechselspiels von pro- bzw. antioxidativer Wirkung bietet das Modell der Tocopherol induzierten Peroxidation (Tocopherol-mediated peroxidation, TMP) (Stocker 1994). Es unterstreicht die Rolle sog. Co-Antioxidantien wie Ascorbat bei der Regeneration des α -Tocopherol und beschreibt oxidative Bedingungen, unter denen α -Tocopherol prooxidativ wirken kann. Der zugrundeliegende Mechanismus sind dem TMP-Modell zufolge das Mikromilieu, in dem die α -Tocopherol-Radikale entstehen. Ist die Verfügbarkeit von α -Tocopherol-regenerierenden Antioxidantien zu gering und die Intensität des oxidativen Streß nur mäßig, so kann von den α -Tocopherol-Radikalen eine Radikale-bildende Wirkung ausgehen (Stocker 1994). α -Tocopherol wird unter diesen Bedingungen zum Transporteur von Radikalen von der wäßrigen in die lipophile Phase.

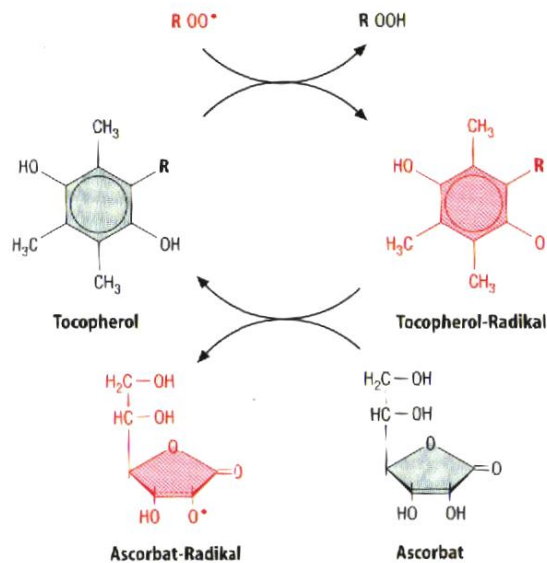


Abbildung 8: Regeneration von Tocopherol durch Ascorbat (Löffler et al. 1997, S. 515)

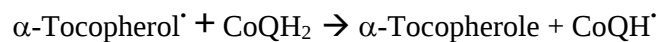
Das Fazit dieser Studie ist, daß α -Tocopherol immer dann als Antioxidans wirken kann, wenn die Konzentrationen und Co-Oxidantien hoch genug sind, um die α -Tocopherol-Radikale effektiv zu recyceln (Kontush et al. 1996). Die hohe Effizienz der Regeneration von α -Tocopherol-Radikale durch Ascorbat und Bilirubin zusammen mit deren hohen Plasma-Konzentrationen bedeutet, daß unter physiologischen Bedingungen α -Tocopherol i.d.R. als Antioxidans wirken sollte, und zwar unabhängig von den oxidativen Verhältnissen. Allerdings ist es denkbar, daß α -Tocopherol als Prooxidans agiert, wenn unter milden oxidativen Bedingungen die Vorräte an Co-Oxidantien erschöpft sind.

Ubichinol-10

Ein weiterer Bestandteil des lipophilen antioxidativen Abwehrsystems ist **Ubichinol** bzw. reduziertes Coenzyme Q. Es setzt sich aus einem Chinolring und einer Isoprenoidseitenkette zusammen. Ubichinol-10 ist ein membranständiges Molekül und aufgrund seiner Redoxeigenschaften funktioneller Bestandteil der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette. Zudem besitzt Ubichinol auch antioxidative Funktionen. Es wird angenommen, daß Ubichinol die Fähigkeit besitzt, wie α -Tocopherole Peroxyl-Radikale einzufangen:



Es gibt desweiteren Hinweise darauf, daß Ubichinol, ähnlich wie bei Ascorbat bereits geschildert, α -Tocopherol-regenerierende Funktionen besitzt.



Ubichinol-10 scheint eine bedeutende Rolle beim antioxidativen Schutz von LDL-Partikeln zu spielen (Stocker et al. 1991). Kontush et al. (1996) zeigten eine negative Korrelation zwischen der Oxidierbarkeit von Antioxidantien-enthaltenen LDL und ihrem Ubichinol-10-Anteil. Mögliche Wirkmechanismen sind direktes Einfangen von freien Radikalen innerhalb der LDL-Partikel bzw. kontinuierliches Recycling von α -Tocopherol.

Die Konzentration von Ubichinol im Liquor ist sehr niedrig und etwa 100fach geringer als im Plasma. Trotz des lipophilen Charakters von Ubichinol gibt es keine erkennbare Korrelation zwischen den Ubichinol-Spiegeln in Plasma und Liquor, möglicherweise aufgrund ausgeprägter Plasma-Protein-Bindung (Lönnrot et al. 1996).

Karotine

β -Karotine gehört zur großen Gruppe der mehr als 4000 Karotinoiden, von denen etwa 50 Provitamin-A-Aktivität besitzen. Strukturell betrachtet sind Karotine Isoprenderivate, genauer aus vier Isopreneinheiten zusammengesetzte Alkohole. Die Provitamin-Wirkung von β -Karotin hängt von der Konversionsrate zu Vitamin A ab, da die Spaltung von β -Karotin zu zwei Molekülen Vitamin A führt (Biesalski et al. 1995).

Neben ihrer Funktion als Provitamin entfalten β -Karotine auch eigene Wirkungen. Da Karotinoide rasch oxidiert werden, können sie als präventive Antioxidantien die Oxidation anderer Substanzen verhindern.

Der zugrundeliegende Mechanismus der antioxidativen Wirkung ist das „Quenchen“ (Inaktivieren) aktivierter Sauerstoffverbindungen (z.B. Singulett-Sauerstoff). Auf diese Weise kann die Bildung freier Radikale verhindert werden (Miller et al. 1996).

1.4 Oxidative Parameter und AD

Wenn auch die zugrundeliegenden Mechanismen für die Veränderungen im antioxidativen System (mangelnde Resorption von Antioxidantien, mangelhafte Ernährung, gesteigerter Metabolismus von Antioxidantien) nicht befriedigend erforscht sind, gibt es gesicherte Daten, die zeigen, daß es im Verlauf der AD zu statistisch signifikanter Verminderung verschiedener Antioxidantien kommt.

Beschrieben wurden signifikante Abnahmen der Serum-Konzentrationen von GSH-Px, der Vitamine E, C und A, sowie von Zink, Transferrin und Albumin (Jeandel et al. 1989). Sowohl im Liquor als auch im Plasma ist die Konzentration an Ascorbat gegenüber den Normalwerten von Gesunden signifikant erniedrigt (Schippling et al. 1999).

Veränderungen in der Oxidationskinetik von Plasma und Liquor geben ebenfalls Hinweise auf eine Störung der antioxidativen Abwehr. So sind die Oxidationsraten in Plasma und Liquor bei AD-Patienten gegenüber denen der Gesunden signifikant erhöht (Schippling et al. 1999)

1.5 Therapeutischer Einsatz von Antioxidantien bei der Behandlung der AD

1.5.1 Argumente für eine Supplementationstherapie

Wenn oxidativer Streß bzw. das Wirken freier Radikale maßgeblich an der Pathogenese der AD beteiligt ist und dies möglicherweise sogar in einem unmittelbaren Zusammenhang mit Veränderungen von antioxidativen Parametern im Organismus der Erkrankten steht, ergeben sich therapeutische Perspektiven. Es gibt Hinweise darauf, daß die Supplementation antioxidativer Vitamine den neuronalen Verfall reduzieren und den fortschreitenden Verlauf der Krankheit verlangsamen können.

Eine Vielzahl experimenteller Studien konnte bereits Anzeichen für eine antioxidative und somit protektive Wirkung von Vitamin E und Vitamin C zeigen:

Urano et al. (1997) zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit des nervalen Gewebes Vitamin E-defizienter Ratten gegenüber hyperoxischen Bedingungen im Vergleich zu normalen bzw. Vitamin E-supplemetierten Ratten. U.a. war das Ausmaß der oxidativ bedingten Erhöhung der Permeabilität synaptischer Membranen bei Vitamin E-behandelten Ratten deutlich geringer als bei normalen bzw. Vitamin E-defizienten Ratten.

Palozza et al. (1992) wiesen die Lipidperoxidation-suppremierende Wirkung von α -Tocopherolen durch Untersuchungen der Auswirkungen von α -Tocopherol auf AAPH-induzierte Lipid-Peroxidation mikrosomaler Membranen nach. Die Zugabe von α -Tocopherol inhibierte deutlich die Produktion von Malondialdehyde und verursachte eine klare lag-Phase in der Oxidationskinetik und zwar in konzentrationsabhängiger Weise.

Waters et al. (1997) zeigten, daß α -Tocopherol zusammen mit Ascorbat liposomale Fettsäuren während einer 4-stündigen Inkubationszeit komplett vor AAPH-induzierter Lipoperoxidation zu schützen vermochte.

Koppal et al. (1998) beschrieben schließlich die protektive Wirkung von α -Tocopherol auf A β -induzierte Schäden synaptosomaler Membranen.

Eine Reihe von Untersuchungen belegt die inhibitorischen Auswirkungen der Supplementati-on von Antioxidantien auf die Bildung von Lipidperoxidationen anhand der Oxidationskinetik in Plasma und Liquor. Oxidationsmessungen bei in vitro Supplementationen zeigten, daß eine Reihe hydrophiler und lipophiler Antioxidantien, darunter auch Ascorbat und α -Tocopherol die Oxidationsraten bzw. den zeitlichen Verlauf der Oxidation inhibitorisch beeinflussen (Karten et al. 1997; Arlt. et al. 1999; Regnström et al. 1993).

Auch klinische Studien verweisen auf den Nutzen einer Supplementationstherapie. Sano et al. (1997) zeigten in einer randomisierten, multizentrischen Studie mit an AD erkrankten Patienten eine durch 2-jährige α -Tocopherol- und Selegiline-Einnahme herbeigeführte, deutliche Verbesserung verschiedener klinischer Parameter. Neben der signifikanten Verzögerung von Ereignissen des „primary-“ und des „secondary outcome“ kam es zur Abnahme neurologischer Symptome und Anhebung des baseline-score der Mini-Mental-State-Examination. Zusammenfassend zeigte diese Studie, daß Selegiline bzw. α -Tocopherol möglicherweise in der

Lage sind, den klinisch bedeutsamen zunehmenden funktionellen Verlust im Verlauf der AD hinauszuzögern.

1.5.2 Probleme und ungeklärte Fragen

Voraussetzung für den therapeutischen Nutzen von supplementierten Antioxidantien auf die neurologischen Funktionen im Rahmen neurologischer Erkrankungen wie der AD ist das Erreichen des Zielorgans, des zentralen Nervensystems. Entscheidend sind dabei die effektive Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und verlässliche Daten über Wirkkonzentrationen im ZNS. Mehrere Studien stellen jedoch eine signifikante Korrelation der Serum- bzw. Liquorkonzentrationen verschiedener Antioxidantien infrage.

In einer Untersuchung der Tocopherol-Spiegel in Liquor und Sera von 40 gesunden männlichen Testpersonen (Vatassery et al. 1991) betrug die durchschnittliche Konzentration von α - und γ -Tocopherol 39,2 und 7,8 nmol/L. Zwar korrelierten sowohl im Serum als auch in der CSF die Konzentrationen von α - und γ -Tocopherol statistisch signifikant. Keine signifikante Korrelation dagegen ergab der Vergleich von α - und γ -Tocopherol-Spiegeln im Serum einerseits und CSF andererseits.

Ein noch weitgehend ungeklärter Transportmechanismus könnte dem Eintritt der Tocopherole (und anderer lipophiler Antioxidantien) ins ZNS klare Grenzen setzen. Die von Vatassery et al. (1991) beschriebene starke Korrelation zwischen der α -Tocopherol-Konzentration im Liquor und der totalen Protein- und Albumin-Konzentration weisen in diese Richtung. Möglicherweise betritt α -Tocopherol das Kompartiment der CSF als Tocopherol-Protein-Komplex. Unterstützung findet diese Hypothese durch die Beobachtungen, daß α -Tocopherol im Plasma an Lipoproteine gebunden ist (Pappert et al. 1996).

Die zitierten Beobachtungen, daß die Supplementation von α -Tocopherol und anderen lipophilen Antioxidantien, in Dosen, die zu einem klaren und überdeutlichen Anstieg der Plasma-Spiegel führen, nicht entsprechend mit einem Anstieg der Konzentrationen im Liquor einhergehen, bedürfen weiterer Untersuchung, da mit ihnen eine Reihe wissenschaftlicher und klinischer Fragestellungen verbunden sind

Eine zusätzlicher Aspekt, der der Klärung bedarf, ist die mögliche prooxidative Potenz verschiedener Antioxidantien. Ist es etwa möglich, durch eine hochdosierte Supplementation mit

erklärten Antioxidanzien aufgrund des prooxidativen Potentials dieser Substanzen statt eines Schutzes sogar eine beschleunigte Schädigung neuronaler Strukturen zu verursachen? Alle diese Fragen bedürfen der raschen Klärung!

1.6 Problemstellung

Der Einfluß der supplementierten Antioxidantien Vitamin C und Vitamin E auf den Oxidationsstoffwechsel bei AD-Patienten soll untersucht werden. Dies soll durch die Charakterisierung der Oxidationskinetik und des Fettsäure-Musters in Plasma und Liquor vor und nach Supplementation geschehen. Außerdem soll der Erfolg der Supplementation d.h. das Erreichen des Zielorgans – des ZNS – dokumentiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit werden die Konzentrationen verschiedener lipophiler und hydrophiler Antioxidantien im Plasma und Liquor der AD-Patienten gemessen. An hydrophilen Antioxidantien werden im Plasma Ascorbat, Urat, Bilirubin und SH-Gruppen, im Liquor lediglich Ascorbat gemessen. An lipophilen Antioxidantien werden im Plasma α - und γ -Tocopherol, α - und β -Karotin und Ubichinol-10 bestimmt, im Liquor nur α - und γ -Tocopherol.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluß der supplementierten Antioxidantien auf den Oxidationsstoffwechsel der Patienten untersucht werden. Zu diesem Zweck wird die Zusammensetzung der Fettsäuren in und die Oxidierbarkeit von Liquor und Plasma gemessen. Zur Bestimmung der Oxidierbarkeit werden Plasma- und Liquor-Proben, gewonnen vor Beginn und nach Abschluß der Supplementation, unter verschiedenen Bedingungen oxidiert und die Oxidationskinetik mithilfe der Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 234 nm nach Regnström et al. (1993) charakterisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

- Gaschromatographisches System (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA):
Gaschromatograph Hewlett-Packard 5890 Series II
Gaschromatographische Säule HP-5MS, 30 m Länge, 0,25 mm innerer Durchmesser, 0,25 µm Filmdicke
- HPLC-System:
LKB 2249 HPLC Pump (LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden)
LKB 2156 Solvent Conditioner (LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden)
Autosampler Marathon (Pharmacia Biotech, Brüssel, Europe)
Elektrochemischer Detektor Coulochem II (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)
Analytical Cell Modell 5012 (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)
Conditioning Cell Modell 5021 (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)
HPLC-Säule LiChroCart 125-4, Li-Chrospher 100 RP-18, 5 µm Partikelgröße (MERCK, Darmstadt, Deutschland)
- Laborzentrifuge Biofuge A (Heraeus, Deutschland)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Deutschland)
- Laborzentrifuge Labofuge Heraeus Christ
- Laborzentrifuge Rotanta/RP (Hettich, Deutschland) für Plasmazentrifugation
- Spektralphotometer Lambda 20 (Perkin-Elmer, Deutschland)
- Spektralphotometer Modell 150-20 (Hitachi, Japan)

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

- 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoylsäure) (DTNB) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Fettsäuremethylester und Oxysterole als Standards für die Gaschromatographie (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Lithiumperchlorat (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
- N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat-Buffered-Saline, PBS) 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,5 g/l Na₂HPO₄ * 2H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄, pH 7,4 (GIBCO BRL)
- Chelex® 100 ion-exchange resins 50-100 mesh (Bio-Rad, München)
- Lipoxidase Typ V from soybean, 630.000 units/mg Protein (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochlorid (AAPH) (Polysciences Inc., Warrington, USA) 33mM & 1mM
- Natriummethoxid (NaMeO), 0,5M in Methanol (ALDRICH®)
- Meta-Phosphorsäure, HPO₃: 10% und 5% in destilliertem Wasser (Merck)
- Citrat-Acetat-Puffer, pH 4,15 (Merck)
- 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) – Natriumsalz: 0,1 mg/ml in dest. Wasser (Sigma)

- Pufferlösung: Phosphatpuffer 50 mmol/l bei pH 7,0 und 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzolsulfonsäure 4,2 mol/l (Merck 1.14342./1)
- Reagenzgemisch, enthält 4-Aminophenazon 6 mmol/l, Peroxidase ≥ 20 U, Uricase ≥ 4 U (Merck 1.14342./2)
- Standard-Lösung, enthält Harnsäure 8 mg/ dl
- NaNO_2 -Lösung, 100 mg/ml in H_2O – kurz vor der Bilirubin-Bestimmung wird diese Lösung 20fach verünnt
- Ammoniumsulfamat, 10 mg/ml in H_2O
- Reagenzlösung: Ethylanthranilat (FLUKA Chemie AG)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Sigma®)
- Na_2EDTA 2mM in wäßriger 0,2M Na_2HPO_4 -Lösung (pH 9,0)
- Chloroform/MeOH 2:1 Lösung (zur Lipidextraktion nach Folch et al. (1957))
- denaturiertes Ethanol für HPLC, (SIGMA-ALDRICH)

Alle anderen Chemikalien wurden entweder von Merck, Darmstadt (Deutschland) oder Sigma Chemie, Taufkirchen (Deutschland) bezogen.

2.3 Patienten

Für die Teilnahme an der Studie konnten aus dem Patientengut der Gedächtnisstunde der Psychiatrischen Klinik am Universitätskrankenhaus Eppendorf im vorgegebenen Zeitraum neun geeignete Patienten ausgewählt werden, die einwilligungsfähig waren.

Tabelle 2: Charakterisierung der Studienteilnehmer

Nr.:	0030	0066	0070	0227	0230	0244	0247	0264	0268
Alter	63	79	82	75	66	69	70	77	60
Geschlecht	w	w	m	m	w	w	w	w	w
Größe (cm)	165	167	182	168	165	154	163	171	172
Gewicht (kg)	61,0	63,6	90,0	72,2	72,0	54,3	66,0	70,9	64,5
BMI (kg/m^2)	22,4	22,8	27,2	25,6	26,5	22,9	24,8	24,3	21,8
Severity	mittel	mittel	leicht	leicht	leicht	mittel	schwer	mittel	leicht
Age of onset	58	75	79	72	63	65	67	74	57
Minimental-State	22	16	21	21	22	18	9	17	23
Alkoholkonsum*	+	+++	+	++	++	++	+++	+	++
Tabakkonsum**	vorher	nein	vorher	vorher	nein	nein	ja	vorher	nein
KHK	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Hypertonie	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja
Apo-E1 ($\mu\text{g/ml}$)	31,0	78,8	99,0	80,4	54,0	82,4	92,8	30,5	75,3
APO-E-Genotyp	3/4	3/4	2/4	3/4	3/3	3/3	3/4	3/4	4/4
TFA (mg/ml)	1093,4	1256,4	631,9	1003,2	1283,6	1224,2	1360,1	1652,4	1176,9

* + = nie, ++++ sehr häufig

** vorher = kein aktueller Tabakkonsum

Erst nach Beendigung der Messungen sowie der statistischen Analysen wurde bekannt, daß der Patient mit der Code-Nr. 0264 schon vor Beginn der Supplementation täglich 500 mg Vitamin C sowie 200 mg Vitamin E oral erhielt und zwar über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr bis unmittelbar vor Beginn der Studie.

2.4 Vorbereitung der Plasmaproben und Supplementation

Die Patienten der Studie erhielten für den Zeitraum der Supplementation (4 Wochen) täglich:

- zweimal täglich 500 mg Vitamin C (Ascorvit®, Jenapharm)
- einmal 400 mg Vitamin E (Ephynal®, Roche)

Den Patienten wurde vor Beginn und nach Abschluß der Supplementation 40 ml venöses EDTA-Nüchternblut abgenommen. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Experimente mit Plasma durchgeführt, welches sofort nach der Zentrifugation bei -80°C unter Stickstoff eingefroren wurde. Die Lagerungsdauer betrug höchstens 3 Monate. Die Verwendung der Proben wurde unter möglichst schonenden Bedingungen durchgeführt (auf Eis oder unter Stickstoff), um unkontrollierte Oxidationsprozesse so gering wie möglich zu halten.

Zusätzlich wurde den Patienten Liquor punktiert, insgesamt 2 x 6 ml. Direkt nach Abnahme wurde der Liquor bei -80°C unter Stickstoff eingefroren und innerhalb von 3 Monaten gemessen.

2.5 Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien

2.5.1 Vitamin-C Bestimmung in Plasma und Liquor

Meßprinzip

Photometrische Bestimmung der Vitamin C-Konzentration: Ascorbat reduziert den Farbstoff 2,6-dichlor-phenolindophenol und verursacht dadurch eine Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 512 nm. Die Reaktion muß bei pH 3 – 4,5 stattfinden. Für jede individuelle Plasmaprobe muß ein Blindwert erstellt werden, bei dem der Farbstoff vollständig reduziert ist.

Durchführung:

Plasma: das Plasma wird kurz nach der Blutentnahme mit der 10% igen Meta-Phosphorsäure gemischt. Dadurch werden Ascorbat-metabolisierende Enzyme deaktiviert.

600 µl Plasma wird mit 10 % Meta-Phosphorsäure (600µl) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Nach kurzem vortexen wird es dann bei 13000 rpm 3 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird ein Überstand von 400µl abgenommen und in eine Küvette pipettiert. Es folgt die Zugabe von 200µl Citrat Acetat Puffer.

Liquor: die Bestimmung der Ascorbat-Konzentration im Liquor erfolgt analog zu der im Plasma. Ausnahme: 150 µl Liquor wird mit 150 µl 10 % Meta-Phosphorsäure und 300 µl 5 % Meta-Phosphorsäure, sorgfältig vermischt und bei 13000 rpm 3 Minuten lang zentrifugiert. Die folgenden Schritte entsprechen denen der Plasma-Ascorbat-Bestimmung.

Unmittelbar vor der Messung wird 200µl DCIP hinzugegeben. Nach kurzem Durchmischen mit dem Vortex-Mixer wird bei 512 nm Wellenlängen die Absorption gemessen.

Nach dieser ersten Messung gibt man einige Partikel Ascorbat in die Küvette, verrührt diese bis zum Eintreten der Entfärbung. Nun wird ein zweites Mal bei gleicher Wellenlänge die Absorption bestimmt (dies ist der Probenblindwert).

Standards: Herstellen einer Verdünnungs-Eichreihe (Ascorbat in 5 % Meta-Phosphorsäure) beginnend bei 20 µg/ml bis 0,625 µg/ml.

Reagenzienblindwerte: 400 µl 5 % Meta-Phosphorsäure wird mit je 200 µl DCIP und 200 µl Citrat-Acetate-Puffer vermischt und anschließend bei 520 nm gemessen.

Berechnung der Ascorbat-Konzentration:

Die Konzentration von Ascorbat errechnet sich wie folgt:

$$\text{Absorption-520nm: } (RB - RBb) - (S - Sb)$$

RB = Reagenzienblindwert vor Reduzierung durch Ascorbat

RBb = Reagenzienblindwert nach Reduzierung durch Ascorbat

S = Absorption der Probe vor vollständiger Reduktion mit Ascorbat

Sb = Probenblindwert; Absorption der Probe nach vollständiger Reduktion mit Ascorbat

Diese Berechnungen werden entsprechend für die Standards durchgeführt zur Erstellung der Eichkurve.

2.5.2 Harnsäure-Bestimmung im Plasma

Verwendete Methode: **Merckotest® (Diagnostika Merck 1.14342.)**

Meßprinzip:

Harnsäure ist ein wichtiges biologisches Antioxidans mit der Fähigkeit, ein Reihe verschiedener Oxidantien einzufangen (Stocker et al, 1991). Harnsäure wird in Gegenwart von Luftsauerstoff durch Uricase in Allantoin umgesetzt. Das dabei gleichfalls entstehende Wasserstoff-Peroxid reagiert mit 3,5-Dichlor-2-hydroxybenzol-sulfonsäure und 4-Aminophenazon unter Katalyse von Peroxidase zu einem roten Chinonimin. Die Extinktion des Chinonimins ist der Harnsäure-Konzentration proportional (Mercktest®).

Durchführung:

Wellenlänge: 520 nm, 546 nm

Inkubationstemp.: 20 – 25 °C

Die Messung erfolgt gegen die Reaktionslösung als Reagenzienleerwert. Pro Meßreihe genügt ein Reagenzienleerwert und ein Standard.

Tabelle 3: Pippettier-Schema zur Bestimmung der Urat-Konzentration im Plasma:

	Probe	Reagenzienleerwert
Probe bzw. Standard	20µl	—
Reaktionslösung	1000µl	1000µl

Nach dem Pippettieren mischen und 15 Minuten bei 20 – 25 °C inkubieren. Anschließend wird die Extinktion der Probe (E_p) bzw. des Standards (E_s) gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Die Extinktion bleibt 30 Minuten stabil.

Berechnung:

$$c = 476 * E_p / E_s \text{ (}\mu\text{mol/l)}$$

2.5.3 Bilirubin-Bestimmung im Plasma

Meßprinzip:

Die Bestimmung der Bilirubin-Konzentration des Plasma erfolgt photometrisch

Durchführung:

Zum Ansetzen der Reagenzlösung suspendiert man 100 µl Ethylanthranilat in 10 ml 0,15 HCl-Lösung und gibt anschließend 300 µl der frisch verdünnten NaNO₂-Lösung hinzu. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten wird 100 µl der Ammoniumsulfamat-Lösung hinzugegeben (Heirwegh et al. 1974). Nur frisch angesetzte Reagenz-Lösung kann zur Messung verwendet werden.

Probenwerte: 100 µl der Plasmaprobe wird mit 1 ml DMSO gemischt und mit 400 µl frisch angesetzter Reagenz-Lösung versetzt. Es folgt die 10 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C. Der Überstand wird nun in Einwegküvetten umgegossen und die Absorption bei Wellenlängen von 530 nm und 650 nm gemessen.

Leerwerte: die Zubereitung der Leerwert-Probe erfolgt analog zu der der Probenwerte, jedoch mit 100 µl der 0,15 M NaCl-Lösung anstatt der 100 µl Plasma.

Standards/Eichreihe: Für die Eichung wird aus einer 250 µM Lösung von Bilirubin in DMSO eine Verdünnungsreihe hergestellt mit Konzentrationen von 250 µM bis 3µM. Jeweils 100 µl der entsprechend verdünnten Lösung werden nun mit 100 µl 0,15 M NaCl-Lösung sowie 900 µl DMSO-Lösung vermischt und mit 400 µl der Reagenzlösung versetzt. Anschließend wird die Absorption bei 530 nm und 650 nm gemessen.

Berechnung:

Die Eichgerade ergibt sich aus der Auftragung der Differenz der Absorption bei 650 nm und 530 nm gegen die Konzentration der Eichlösungen. Die Konzentration der Plasmaproben wird aus der Differenz der Absorption bei 650 nm und 530 nm und der Regressionsgeraden der Eichkurve berechnet (Trotman et al. 1982).

2.5.4 SH-Gruppen-Bestimmung im Plasma

Meßprinzip:

Protein-Thiole können mit spectrophotometrischer Methode und unter Verwendung von DTNB bestimmt werden. Zur Bestimmung der Sulfhydrylgruppen werden von jeder zu messenden Plasma-Probe Lösungen für je einen Probenwert mit bzw. ohne DTNB hergestellt. Dies dient dazu, die jeder Probe eigene Absorption zu eliminieren, die nicht auf die Reaktion zwischen den Sulfhydryl-Gruppen und der DTNB-Lösung zurückzuführen ist, sondern auf Absorption durch Bilirubin, β -Karotinen und anderen Plasmabestandteilen (Motchnik et al. 1994).

Durchführung:

Die Proben sollten auf 37°C erwärmt und in Eppendorf Gefäßen wie folgt angesetzt werden.

Probenwerte: 50 μ l der Plasmaprobe werden versetzt mit 50 μ l NaCl, 900 μ l der EDTA-Lösung sowie 20 μ l der DTNB-Lösung.

Probenleerwerte: analog zum Probenwert wird eine Lösung zubereitet mit 20 μ l 0,025 mM Phosphatpuffer anstatt der DTNB-Lösung.

Die Lösungen für Proben(leer)werte werden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm. Die Absorptionsmessungen erfolgen gegen Luft (Motchnik et al. 1994).

Berechnung:

Die Berechnung der Konzentrationen wird wie folgt durchgeführt:

$$\text{Absorption Abs.} = \text{Abs (Probenwert)} - \text{Abs (Probenleerwert)}$$

$$\text{Konzentration c} = \text{Absorption} * 1500 \text{ (}\mu\text{M)}$$

2.6 Lipophile Antioxidantien

2.6.1 Cholesterin- und Fettsäuren-Messung im Liquor

Verwendete Chemikalien:

- Standard-BHT-Mix: -1,1 g BHT (50 mM)
 - 2,5 mg 5-a Cholestan (25 µg/ml)
 - 20 mg Heptadecansäure-Methylester (17:0) (200 µg/ml)
 - in 100 ml Chlorophorm/MeOH 2:1 (lagern unter Argon bei -20 °C)

Meßprinzip:

- Extraktion der Lipide
- Hydrolyse der TG, Methylierung der Fettsäuren zu Stabilisierung mit NaOCH₃
- Extraktion der methylierten Fettsäuren und des Cholesterins mit Hexan
- Silylierung des Cholesterins zur Stabilisierung mit BSTFA
- Aufnehmen in definiertem Volumen Toluol zum Einspritzen

Technische Daten:

Die Fettsäure Bestimmung erfolgt mithilfe des Gaschromatographen Hewlett-Packard 5890 Serie II, ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor und einer chromatographischen Säule HP-5MS, 30 m Länge, einem internen Durchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm (Kontush et al. 1996).

Durchführung:

Erstellung von Liquor-Proben und Leerwert-Proben:

Liquor-Proben: 300 µl frisch aufgetauter Liquor wird zusammen mit 100 µl der Standard-Lösung und 1ml des Chloroform/Methanol-Gemisches in Glasröhrchen angesetzt und zur Extraktion der Lipide sorgfältig gemischt.

Leerwert-Proben: anstatt der 300 µl Liquor wird nun 300 µl NaCl 0,9 % Lösung verwendet. Ansonsten analoges Vorgehen wie bei den Liquorproben.

Die so gewonnenen Proben (Liquor- und Leerwert-) werden zur Phasentrennung für 10 Minuten zentrifugiert (4000 rpm/ 4°C). Dann werden 600 µl der unteren (organische) Phase abpipettiert, in neue Glasröhrchen übertragen und unter Vakuumzentrifugation verdampft.

Den Rückständen fügt man je 250 µl Toluol und 500 µl Natriummethoxid hinzu, mischt sorgfältig mit dem Vortex-Mixer und inkubiert die Proben 10 Minuten bei 56 °C im Trockenschrank zur Transmethylierung. Nach der Inkubation werden die Proben abgekühlt und mit je

100 µl 25 % Essigsäure sowie 250 µl n-Hexan versetzt und durchmischt. Darauf folgt erneut ein 10 minütiges Zentrifugieren (4000 rpm, 4°C).

Aus dem Überstand werden 300 µl der Hexan-Phase abgenommen, in Eppendorf® Reaktionsgefäße übertragen und unter Vakuumzentrifugation verdampft. Anschließend werden die Rückstände in je 25 µl n-Hexan und 25 µl BSTFA gelöst, mit Argon begast und unter Luft-Abschluß bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert (Zur Sylierung des Cholesterins). Im Anschluß an diese Inkubationszeit werden die Proben erneut unter Vakuumzentrifugation verdampft und die nun verbleibenden Rückstände in 20 µl Toluol aufgelöst.

Von dieser Lösung werden 2 µl in den Gaschromatographen eingespritzt.

2.6.2 Cholesterin- und Fettsäuren-Bestimmung im Plasma

Die Bestimmung der Fettsäuren des Plasma erfolgt ebenfalls chromatographisch.

Durchführung:

100 µl Plasma wird in Glassröhrchen pipetiert. Hinzugefügt werden 25 µl Heptadecansäure (als interne Standards), 25 µl BHT (als Antioxidans) sowie 2 ml eines 4: 1 Methanol/Toluol-Gemisches (Kontush et al. 1996). Unter anhaltendem Durchmischen mithilfe des Vortexmixers wird langsam 200 µl Acetylchlorid hinzugefügt. Das langsame Pipetieren des Acetylchlorid ist sehr wichtig! Ansonsten kommt es zu Materialverlusten aufgrund von Evaporation. Nachdem die Glassröhrchen sorgfältig verschlossen wurden, werden die Proben 1 Stunde im Trockenschrank bei einer Temperatur von 100 °C inkubiert. In dieser Zeit läuft der Transesterifikations-Prozeß ab (Lepage et al. 1986).

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Proben 5 Minuten in Wasser gekühlt. Dann fügt man 5 ml einer 6 % Na₂CO₃-Lösung hinzu und mischt sorgfältig (30 sec Mischen mit Vortexmixer) Hierdurch wird der Transesterifikations-Vorgang beendet (Lepage et al. 1986). Im Anschluß daran werden die Röhrchen für 10 Minuten zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C).

Vom Überstand (der Toluol-Phase) werden nun zwischen 250 µl und 300 µl abpipetiert (die exakte Menge ist aufgrund des internen Standards nicht entscheidend!) und mithilfe der Vakuumzentrifuge verdampft. Der verbleibende Rückstand wird in 20 µl Toluol gelöst. Von dieser Lösung spritzt man nun 2 µl in den Gaschromatographen ein.

Die Auswertung des Chromatogramm erfolgt durch Flächen-Integration der Detektions-Peaks.

2.6.3 Chromatographische Bestimmung der lipophilen Antioxidantien in Plasma und Liquor

Verwendete Reagenzien:

- ethanolische Lösung interner Standards:
100 µl enthalten:- 40 µl delta-Tocopherol, (56 µM)
- 30 µl Ubichinol-9, (2 µM)
- 30 µl Ubichinon-7, (5,6 µM)

Plasma: an lipophile Antioxidantien werden α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Ubichinol-10, α -Karotin und β -Karotin in einer Simultanbestimmung mit reversed-phase-HPLC gemessen (Finckh et al. 1995). Zudem wird als primäres Oxidationsprodukt Ubichinon-10 registriert. Als interne Standards dienen δ -Tocopherol, Ubichinon-7 und Ubichinol-9. Ubichinol-9 wird über die Reduktion von Ubichinon-9 durch Natriumdithionit zubereitet (Lang et al. 1986).

Liquor: an lipophilen Antioxidantien werden lediglich α -Tocopherol und γ -Tocopherol gemessen.

Zusätzlich werden externe Standards verwendet. Die Standard-Lösungen werden erhalten durch Ansetzen entsprechender Mengen der reinen Standards in Ethanol (Tocopherole, Ubichinon-7, Ubichinon-9, Ubichinon-10, Karotine). Die Konzentrationen und Reinheit der Standard-Lösungen wird geprüft durch bekannte Extinktions-Koeffizienten und erhältliche Spektren von Karotinen, Tocopherolen, Ubichinolen und Ubichinonen (Finckh et al. 1999).

Meßprinzip:

Die Messung einzelner lipophiler Antioxidantien einer entsprechend aufbereiteten Plasma- bzw. Liquorprobe durch ein HPLC-System beruht auf zwei wesentlichen Prinzipien:

1. der **Trennung** der einzelnen Komponenten des Substanzgemisches
2. der quantitativen **Detektion** der einzelnen Komponenten

Verwendet wird eine HPLC-Säule LiChroCart 125-4 Säule bei einer Flußrate von 1,4 ml/min und einem Druck von ca. 14 MPA.

Die **Trennung** des Substanzgemisches in einzelne Komponenten erfolgt in der Säule. Der chromatographische Trennprozeß geschieht aufgrund von physiko-chemischen Wechselwirkungen der Substanzen mit der mobilen Phase (dem Laufmittel) bzw mit der stationären Pha-

se (der chromatographischen Säule). Durch die unterschiedlichen Retentionszeiten der einzelnen Komponenten in der stationären Phase der Säule kommt es zum Auftrennen des Gemisches.

Durchführung:

Als Laufmittel dient ein mit Helium begastes Lösungsmittelgemisch aus Methanol : Ethanol : iso-Propanol in einem Verhältnis von 18 : 5 : 2 und einem Zusatz von 13,4 mM Lithiumperchlorat.

Die **Detektion** erfolgt mit einem elektrochemischen Detektor (Coulochem II, Environmental Sciences Assoc., Bedford USA) der mit zwei verschiedenen Meßzellen verbunden ist. Diese arbeiten in einem Reduktions-Oxidations-Modus. Nach initialer Trennung passieren die Komponenten die beiden Meßzellen in folgender Reihenfolgen: zunächst die erste Zelle (conditioning cell, model 5021, Potential E= -600 mV). Darauf folgt die Detektion durch die zweite Zelle (analytical cell, model 5011, Potential von E1 = -150 mV, E2= +600 mV) (Finckh et al. 1999). Die chromatographischen Daten werden dann mithilfe der „Hyperdata chromsoft“-Software (Bischoff Analystechnik, Leonberg, Germany) ausgewertet.

Plasma: 100 µl einer Plasmaprobe werden mit 100 µl der ethanolischen Lösung interner Standards vermischt und zur Lipidextraktion mit 500 µl n-Hexan versetzt. Nach wiederholtem Mischen mit dem Vortex-Mixer wird die Probe nun bei 13000 rpm und 4°C 3 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand (der oberen Hexan-Phase) werden 400µl abpipettiert und anschließend das Lösungsmittel unter Vakuumzentrifugation verdampft. Der verbleibende Rückstand wird in 1 ml Ethanol gelöst. Von dieser Lösung werden 150 µl mit einer Syringe (5-500 µl, Hewlett-Packard) in das HPLC-System eingespritzt.

Liquor: Die Vorbereitung der Injektionslösung erfolgt analog zu der von Plasmaproben mit folgenden Ausnahmen: Anstatt der 100 µl Lösung interner Standards fügt man 100 µl Ethanol hinzu. Am Ende der Zubereitung werden die in den Eppendorf-Gefäßen verbleibenden Rückstände mit 150 µl Ethanol gelöst. Die gesamten 150 µl werden schließlich eingespritzt.

Die Auswertung der Konzentrationen erfolgt nach Finckh et al (1995).

2.7 Bestimmung der Oxidierbarkeit von Plasma und Liquor

Meßprinzip:

Die Bestimmung der Oxidierbarkeit des Plasmas erfolgt mithilfe des Photometers. Bei der Oxidation von Lipiden entstehen Hydroperoxide. Deren konjugierte Diene werden durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm quantitative gemessen und erlauben einen Rückschluß auf die Oxidierbarkeit der Lipoproteine des Plasmas (Kontush et al. 1996).

Durchführung:

Plasma: Zur verlässlichen Messung des zeitlichen Verlaufs der Oxidation im Plasma muß die Absorption der verwendeten Probe ausreichend stark verdünnt sein (150fach), vergleichbar mit Regnström et al.(1992) und Schnitzer et al.(1995).

Zu jeder Messung werden folgende Proben vorbereitet:

Plasmaprobe + Oxidans: 20 µl Plasma wird verdünnt in 2950 µl PBS (zuvor behandelt mit Chelex). 30 µl Oxidans (jeweils mit 33 mM AAPH oder Lipoxidase) wird hinzugefügt.

Plasmaleerprobe (Autooxidation): 20 µl Plasma wird verdünnt mit 2980 µl PBS (behandelt mit Chelex).

Standards: 30 µl des jeweiligen Oxidans (33 mM AAPH / Lipoxidase) wird verdünnt in 2970 µl PBS (behandelt mit Chelex).

Tabelle 4: Pipettierschema zur chromatographischen Bestimmung der lipophilen Antioxidantien im Plasma

	Plasma	PBS	AAPH	Lipoxidase
1. Probe + AAPH (33mM)	20 µl	2950 µl	30 µl	-----
2. Probe + Lipoxidase	20 µl	2950 µl	-----	30 µl
3 Leerprobe	20 µl	2980 µl	-----	-----
Standard AAPH (33mM)	-----	2970 µl	30 µl	-----
Standard Lipoxidase	-----	2970 µl	-----	30 µl

Liquor: zur Bestimmung der Oxidierbarkeit des Liquors wird ein etwas abweichendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 5: Pippettierschema zur chromatographischen Bestimmung der lipophilen Antioxidantien im Liquor

	Liquor	PBS	AAPH	EDTA
1. Probe + AAPH (1mM)	100 µl	800 µl	100µl	-----
2. Leerprobe	100 µl	900 µl	-----	-----
3 Probe + EDTA (1mM)	100 µl	800 µl	-----	100 µl

Tabelle 6: Leerproben

	Liquor	PBS	AAPH	EDTA
Standard AAPH (1mM)	-----	900 µl	100 µl	-----
Standard EDTA (1mM)	-----	900 µl	-----	100 µl

Die Verdünnung des Liquors ist also wesentlich geringer als die im Plasma. Der Verdünnungsfaktor beträgt nur 10 im Gegensatz zum Verdünnungsfaktor 150 bei der Oxidation von Plasmaproben.

Die entsprechend vorbereiteten Proben werden in 3 ml Präzisions-Küvetten aus Quarzglas SUPRASIL® überführt, luftdicht verschlossen, in den bei 37 °C temperierten Wechsler des SpectroPhotometers gestellt und die Messung gestartet (Kontush et al. 1996). Das SpectroPhotometer mißt die Proben jede Minute bei einer Wellenlänge von 234 nm über einen Zeitraum von 6 Stunden (bei Plasmaproben) bzw. 48 Stunden (bei Liquorproben). Anschließend werden die kinetischen Daten ausgewertet.

Auswertung:

In der Regel wird bei Plasma Inkubationen in Anwesenheit von AAPH oder Lipoxidase ein monotoner Anstieg der Absorptionsraten bei 234 nm registriert. Unter diesen Bedingungen erhaltene Oxidationskurven werden daher mithilfe eines einzelnen Parameters, z.B: die mean oxidation rate beschrieben.

Zur Auswertung der Oxidations-Kinetik bei Liquor-Proben siehe Ergebnisteil.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung des Alzheimer-Gesamtkollektivs

Das von mir erfaßte Kollektiv der AD-PatientInnen umfaßt 27 Personen ($n = 27$) im Alter von 51 bis 85 Jahren. Gemein war allen diesen Patienten die Diagnose der AD, davon waren 3 schwere, 9 mittlere und 13 leichte Verläufe (bei 2 Patienten keine Angaben). Das Alter beim Ausbruch der Erkrankung beträgt im Mittel 71 Jahre. Der durchschnittliche Wert der Mini-mental-Examination beträgt $18,1 \pm 5,9$. Die Daten dieses AD-Kollektivs wurden verglichen mit einem Kollektiv von 16 gesunden Personen.

3.1.1 Plasma

Die Bestimmung der Plasma-Parameter erstreckte sich auf allgemeine Daten des Lipidstoffwechsels, die hydrophilen Antioxidantien Ascorbat, Urat, Bilirubin und SH-Gruppen, sowie die lipophilen Antioxidantien α - und γ -Tocopherole, α - und β -Karotin sowie Ubichinol-10. Außerdem wurden die Fettsäuren in ihrer Zusammensetzung bestimmt und die Oxidationsraten unter Autooxidation, AAPH-Katalyse und Lipoxygenase ermittelt.

Tabelle 7: Plasma-Parameter im Vergleich

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. AD_Kollektiv	Mittelwert $\pm$ Stdabw. gesunde Kontrollen	N (AD)	N (gesund)	p
Alter	71 $\pm$ 9	64 $\pm$ 9	27	16	0,024
Minimental-State	18,1 $\pm$ 5,9	24,3 $\pm$ 4,7	27	7	0,015
Gesamt-Chol (mg/dl)	217,19 $\pm$ 31,46	225,75 $\pm$ 37,13	27	16	0,424
TG (mg/dl)	161,63 $\pm$ 88,14	159,25 $\pm$ 73,38	27	16	0,928
LDL (mg/dl)	133,52 $\pm$ 28,11	138,56 $\pm$ 28,47	27	16	0,574
HDL (mg/dl)	51,30 $\pm$ 14,94	55,50 $\pm$ 21,19	27	16	0,451
VLDL (mg/dl)	32,37 $\pm$ 17,60	31,75 $\pm$ 14,70	27	16	0,906
APO-B (mg/l)	106,63 $\pm$ 21,58	100,69 $\pm$ 20,18	27	16	0,377
APO-A1 (mg/l)	143,07 $\pm$ 17,51	135,38 $\pm$ 29,69	27	16	0,289

Allgemeine Lipiddaten

Die Analyse der allgemeinen Daten des Lipidstoffwechsels zeigt keine statistisch signifikanten Differenzen. Die Mittelwerte der Konzentrationen der Lipoproteine sind annähernd gleich (LDL: $133,52 \pm 28,11$ mg/dl vs. $138,56 \pm 28,47$ mg/dl; HDL: $51,30 \pm 14,94$ mg/dl vs. $55,50 \pm 21,19$ mg/dl; VLDL: $32,37 \pm 17,60$ vs. $31,75 \pm 14,70$ mg/dl). Auch der Konzentrationsbereich der Triglyceride und des Cholesterins unterscheidet sich kaum. Die Mittelwerte für **Cholesterin** betragen $217,19 \pm 31,46$ mg/dl für das AD-Kollektiv und $225,75 \pm 37,13$ mg/dl für das Kollektiv der gesunden Kontrollpersonen. Für die Triglyceride gilt entsprechendes (TG: $161,63 \pm 88,14$ mg/dl vs. $159,25 \pm 73,38$ mg/dl).

Hydrophile Antioxidantien

Tabelle 8: Hydrophile Antioxidantien im Plasma (μ M)

Variable	Mittelwert + Stdabw. AD_Kollektiv	Mittelwert + Stdabw. gesundes Kollektiv	N (AD)	N (gesund)	p
Ascorbat	$39,77 \pm 15,37$	$62,64 \pm 18,29$	26	15	0,00012
Urat	$290,91 \pm 77,05$	$264,97 \pm 58,79$	27	16	0,253
SH-Gruppen	$431,33 \pm 50,21$	$460,17 \pm 42,53$	27	16	0,062
Bilirubin	$12,29 \pm 2,35$	$13,27 \pm 4,64$	27	16	0,364

Der Vergleich der **Ascorbat**-Konzentrationen zeigt eine sehr klare, statistisch signifikante Differenz. Während der Mittelwert des AD-Kollektivs lediglich $39,77 \pm 15,37$ μ M beträgt, liegt er beim Kollektiv der Gesunden bei einem Wert von $62,64 \pm 18,29$ μ M. Das entspricht einem p-Wert von $p = 0,000117$.

Dagegen zeigen die übrigen hydrophilen Antioxidantien kaum nennenswerte Differenzen. Die Mittelwerte der **Bilirubin**-Konzentration beider

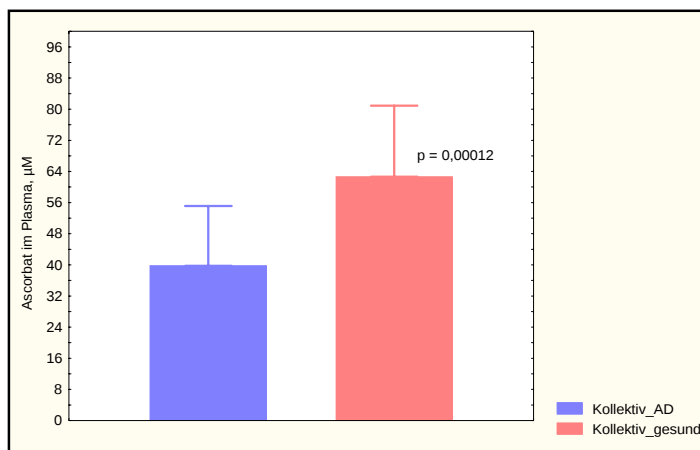


Abbildung 9: Ascorbat im Plasma

Kollektive unterscheiden sich kaum ($12,29 \pm 2,35$ μ M beim AD-Kollektiv vs. $13,27 \pm 4,64$ μ M bei den Gesunden). Die Bestimmungen der **Urat**- und **SH**-

Gruppen-Werte zeigen für Urat mit $290,91 \pm 77,05 \mu\text{M}$ vs. $264,97 \pm 58,79 \mu\text{M}$ einen niedrigeren Mittelwert im gesunden Vergleichskollektiv, während der Mittelwert der SH-Gruppen von $431,33 \pm 50,21 \mu\text{M}$ beim AD-Kollektiv gegenüber den Gesunden mit $460,17 \pm 42,53 \mu\text{M}$ deutlich um 6,3% erniedrigt ist.

Lipophile Antioxidantien

Neben den wasserlöslichen wurden auch die lipidlöslichen Antioxidantien bestimmt, namentlich α -Tocopherol, α -Karotin, β -Karotin und Ubichinol-10. Die Messung erfolgte in einer Simultanbestimmung durch coulometrische Detektion mit der HPLC. Leider waren keine Daten über die γ -Tocopherol-Spiegel im Plasma des gesunden Kollektivs erhältlich, sodaß hier auf Literaturwerte zurückgegriffen werden musste (Kontush, 1999).

Tabelle 9: Lipophile Antioxidantien im Plasma (μM)

Variable	Mittelwert $\pm$ Sdtabw. AD_Kollektiv	Mittelwert $\pm$ Stdabw. gesundes Kollektiv	N (AD)	N (gesund)	p
α -Tocopherol	$26,81 \pm 9,55$	$23,17 \pm 4,04$	27	16	0,156
γ -Tocopherol	$5,59 \pm 3,64$	$4,34 \pm 2,57^*$	27	40*	--
α -Karotin	$0,09 \pm 0,12$	$0,17 \pm 0,09$	27	15	0,022
β -Karotin	$0,76 \pm 0,95$	$0,68 \pm 0,37$	27	16	0,747
Ubichinol-10	$0,66 \pm 0,50$	$0,41 \pm 0,26$	27	16	0,083

Kontrollwerte für γ -Tocopherol aus Kontush et al., 1999

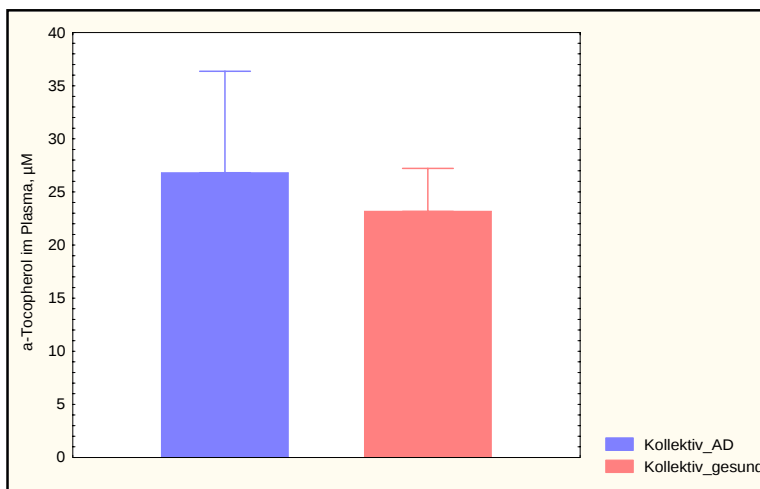


Abbildung 10: α -Tocopherol im Plasma

Die Konzentrationen von **α -Tocopherol** sind in beiden Kollektiven in etwa gleich. Bei den AD-Patienten beträgt sie $26,81 \pm 9,55 \mu\text{M}$, beim Kontroll-Kollektiv $23,17 \pm 4,04 \mu\text{M}$. Das entspricht einem p-Wert von $p = 0,156$. Die übrigen gemessenen lipophilen Antioxidantien liefern folgendes

Bild: Während sich die Konzentrationen von **β -Karotin** und **Ubichinol-10** in den beiden Kollektiven nicht wesentlich unterscheiden (β -Karotin: $0,76 \pm 0,95$ vs. $0,68 \pm 0,37 \mu\text{M}$; Ubichinol-10: $0,66 \pm 0,50$ vs. $0,41 \pm 0,26 \mu\text{M}$), zeigt der Vergleich der Mittelwerte von **α -Karotin**

eine statistisch signifikante Differenz. Der Mittelwert des AD-Gesamtkollektivs beträgt $0,089 \pm 0,116 \mu\text{M}$ und ist somit gegenüber dem Mittelwert des gesunden Vergleichskollektivs mit $0,172 \pm 0,089 \mu\text{M}$ um 47,4% erniedrigt. Das entspricht einem p-Wert von $p = 0,022$.

Fettsäuren

Die simultane Bestimmung von Fettsäuren und Cholesterin erfolgte mithilfe der Gaschromatographie. Die Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge werden deutlich voneinander getrennt. Ungesättigte Fettsäuren werden aufgrund der Unpolarität der Säule früher eluiert als gesättigte Fettsäuren. Cholesterin verbleibt wesentlich länger auf der Säule als die Fettsäuren. Zur Bestimmung der Fettsäure_Fraktionen im Plasma PUFA, MUFA, SFA und TFA wurden folgende Fettsäuren zusammengefaßt:

Tabelle 10: Erfassung der Fettsäuren im Plasma

SFA	14:0 (Myristic), 16:0 (Palmitic), 18:0 (Stearic), 20:0 (Arachidic), 22:0 (Behenic)
MUFA	16:1 n-9, 16:1 n-7 (Palmitoleic), 18:1 n-9 (Oleic), 18:1 n-7 (Vaccenic), 20:1 n-9 (Eicosaenic), 22:1 n-9 (Erucic)
PUFA3	18:3 n-3 (Linoleic), 20:5 n-3 (Eicosapentaenoic), 20:3 n-3 (Eicosatrienoic) 22:6 n-3 (Docosahexaenoic), 22:5 n-3 (Docosapentaenoic)
PUFA6	18:3 n-6 (Gamma-Linoleic), 20:4 n-6 (Arachidonic), 20:3 n-6 (Eicosatrienoic) 20:2 n-6 (Eicosadienoic), 22:4 n-6 (Docosatetraenoic), 22:2 n-6 (Docosadienoic)
PUFA	PUFA3 + PUFA6
TFA	SFA + MUFA + PUFA
SFA%	$(\text{SFA}/\text{TFA}) * 100$
MUFA%	$(\text{MUFA}/\text{TFA}) * 100$
PUFA%	$(\text{PUFA}/\text{TFA}) * 100$

Aufgrund unterschiedlicher Meßbedingungen sind die absoluten Konzentrationen der Fettsäuren nicht miteinander vergleichbar. Daher werden an dieser Stelle nur die prozentualen Anteile der Fettsäure Fraktionen betrachtet.

Das Fettsäure-Muster im Plasma zeigt im Vergleich der beiden Kollektive keine statistisch signifikanten Differenzen. Dennoch sind tendentielle Unterschiede im Fettsäure-Muster zu erkennen. Den größten Anteil machen in beiden Kollektiven die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA%). Bei den AD-Patienten ist dieser Anteil mit $38,50 \pm 4,42 \%$ um 5,7% gegenüber dem des Gesunden-Kollektivs mit $40,84 \pm 3,78 \%$ erniedrigt ($p = 0,175$). Es folgt der Anteil der gesättigten Fettsäuren (SFA%), der keine Differenzen zeigt, mit $34,08 \pm 1,50 \%$ vs. $34,51 \pm 2,20 \%$ ($p = 0,609$) und schließlich der Anteil der einfach gesättigten Fettsäuren (MUFA%), der bei den AD-Patienten klar um 11,2% erhöht ist ($27,42 \pm 3,43 \%$ vs. $24,65 \pm 3,23 \%$; $p = ,056$).

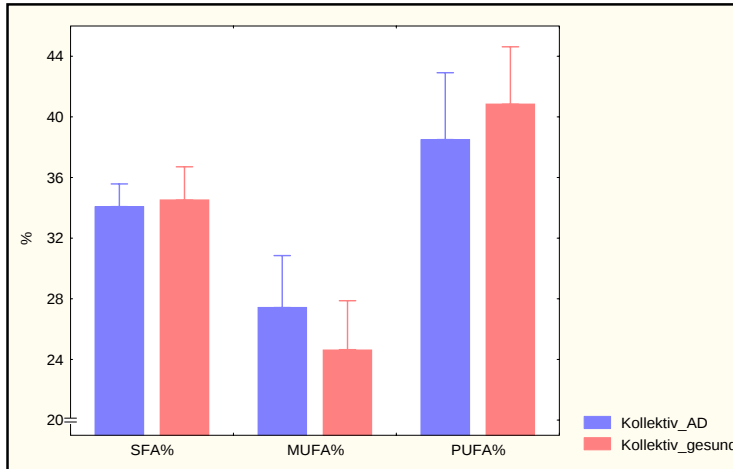


Abbildung 11:
prozentuale Anteile der
Fettsäuren im Plasma

Tabelle 19: Prozentuale Anteile der Fettsäuren im Plasma (%)

Variable	Mittelwert + Stdabw. AD_Kollektiv	Mittelwert ± Stdabw. gesundes Kollektiv	N (AD)	N (gesund)	p
SFA%	34,08 ± 1,50	34,51 ± 2,20	9	16	0,609
MUFA%	27,42 ± 3,43	24,65 ± 3,23	9	16	0,056
PUFA%	38,50 ± 4,42	40,84 ± 3,78	9	16	0,175

Oxidationskinetik im Plasma

Eine verlässliche und leicht reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Oxidierbarkeit des Plasmas ist die kontinuierliche photometrische Messung der Lipidhydroperoxide. Aufgrund ihres strukturellen Aufbaus, den konjugierten Dienen, können diese Lipidhydroperoxide mittels der Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 234 nm quantitativ erfaßt werden (Esterbauer et al. 1989).

Eine Plasmaverdünnung (150fach) mit PBS ist notwendig, um eine Absorption zu erreichen, die niedrig genug ist, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen (Regnström et al. 1993). Die Inkubationszeit der Plasmaproben beträgt 360 Minuten. Die Absorption der Proben wird über den gesamten Zeitraum der Inkubation jede Minute gemessen. Wird Zitrat-Plasma, Heparin-Plasma oder Serum in der Anwesenheit von AAPH (330-1650µM) oder Lipoxygenase (25-250 U/ml) inkubiert, so zeigt die Oxidationskurve in der Regel keine lag-phase. Vielmehr zeigen Plasma-Proben unter diesen Bedingungen einen monotonen Anstieg der Absorption bei 234 nm während der 6h Inkubation. Daher können die Plasma-Oxidationskurven durch einen einzelnen Parameter beschrieben werden. Dies ist die **mean oxidation rate**, die über die gesamte Phase der linearen Oxidation gemittelten durchschnittlichen Oxidationsrate.

Die Oxidationsrate (nM Diene/min) erhält man durch die Umrechnung der Differenz der Absorption bei 234 nm über die Zeit (dA/dt). Die Umrechnung erfolgt über den molaren Extinktionskoeffizienten ε für konjugierte Diene und unter Berücksichtigung der Verdünnung des Plasmas in der Photometerküvette.

$$C = 150 * Abs/\varepsilon$$

Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 29,500 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Die Abbildung 12 zeigt beispielhaft den Verlauf der Plasma-Oxidationskurven bei enzymatischer Katalyse durch AAPH bzw. Lipoxxygenase sowie unter Autooxidation. Nicht abgebildet sind die Graphen der Standard-Leerproben (AAPH- und Lipoxxygenase-Leerprobe).

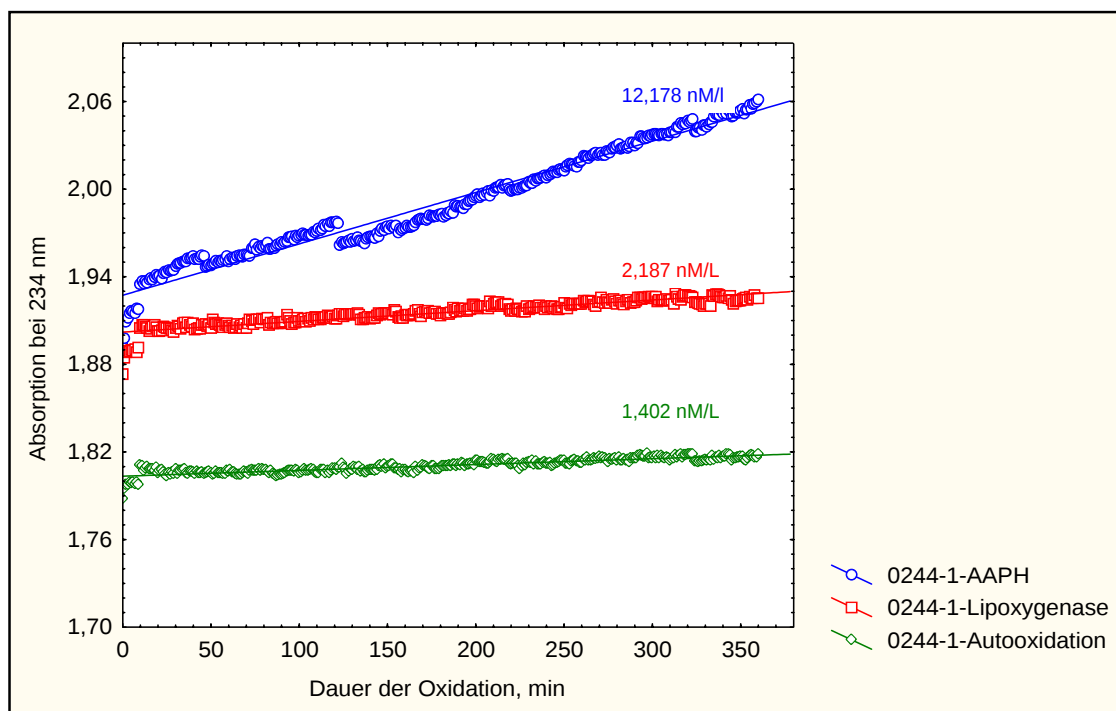


Abbildung 12: Oxidationskurven der Plasmaprobe 0244-1; abgebildet sind die Kurvenverläufe unter der Katalyse durch AAPH, Lipoxxygenase und unter Autooxidation (dA/min) sowie die daraus errechneten Oxidationsraten bzw. die mean oxidation rate

Oxidationskinetik im Plasma

Die Auswertung der Oxidationskinetik im Plasma liefert zunächst die drei folgenden Parameter:

1. Unter dem Einfluß von AAPH - **Oxi-Rate_AAPH**
2. Bei Katalyse durch Lipoxxygenase - **Oxi-Rate_LIPO**
3. Unter reiner Autooxidation - **Oxi-Rate_AUTO**

Unter allen drei Bedingungen zeigen sich klare, wenn auch nicht immer statistisch signifikante Differenzen. Am deutlichsten fallen die Unterschiede bei der **AAPH**-induzierten Oxidation aus. Der Mittelwert der Oxidationsrate beträgt hier für das AD-Kollektiv $12,84 \pm 2,46$ nM Diene/min, während der Wert für das Kollektiv der Gesunden bei nur $4,19 \pm 2,35$ nM Diene/min liegt. Der p-Wert ist dementsprechend niedrig ($p < 0,001$).

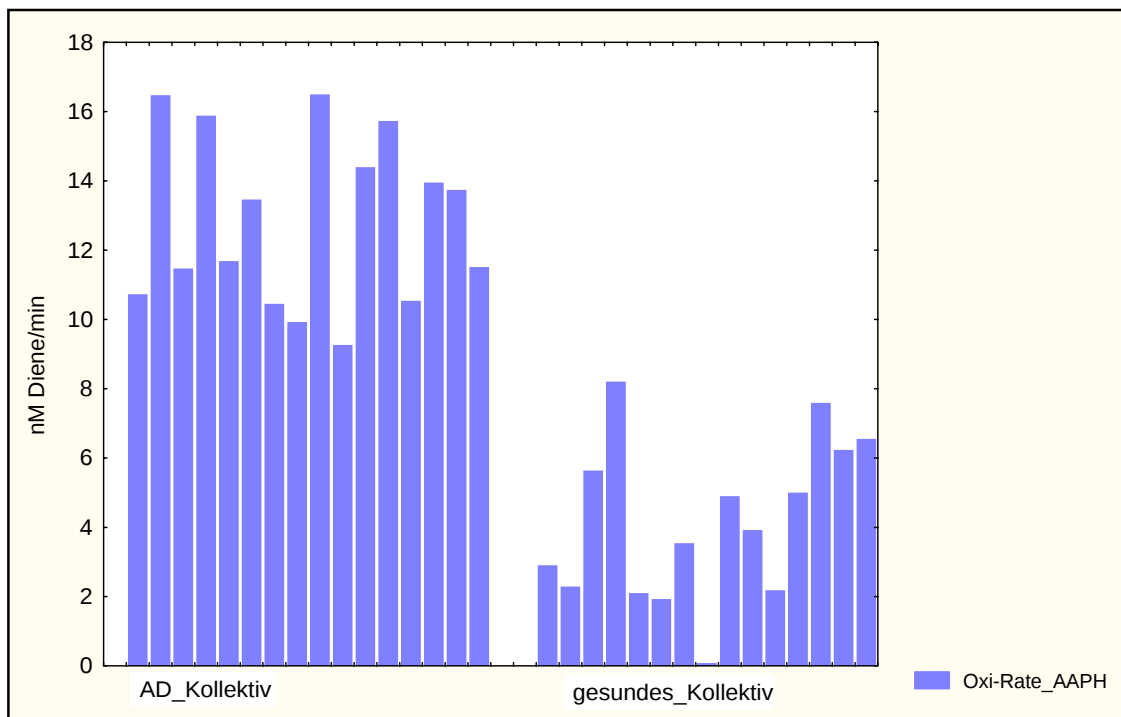


Abbildung 13: Oxidationsrate unter AAPH-Katalyse

Die Meßergebnisse für Lipoxxygenase bzw. für Autooxidation sind zwar nicht statistisch signifikant, sie zeigen jedoch die gleiche Tendenz. Die Oxidationsrate unter Zusatz von Lipoxxygenase beträgt für das AD-Kollektiv $1,79 \pm 1,82$ nM Diene/min, dagegen nur $1,18 \pm 2,14$ nM Diene/min für das gesunde Vergleichskollektiv ($p = 0,401$). Deutlicher fällt wiederum die Differenz bei der Rate der Autooxidation aus. Der Mittelwert für das AD-Kollektiv liegt bei

1,45 ± 1,35 nM Diene/min, für das gesunde Vergleichskollektiv bei 0,56 ± 1,66 nM Diene/min. Das entspricht einem p-Wert von $p = 0,109$.

Abbildung 14:
Oxidationsraten bei
Autooxidation

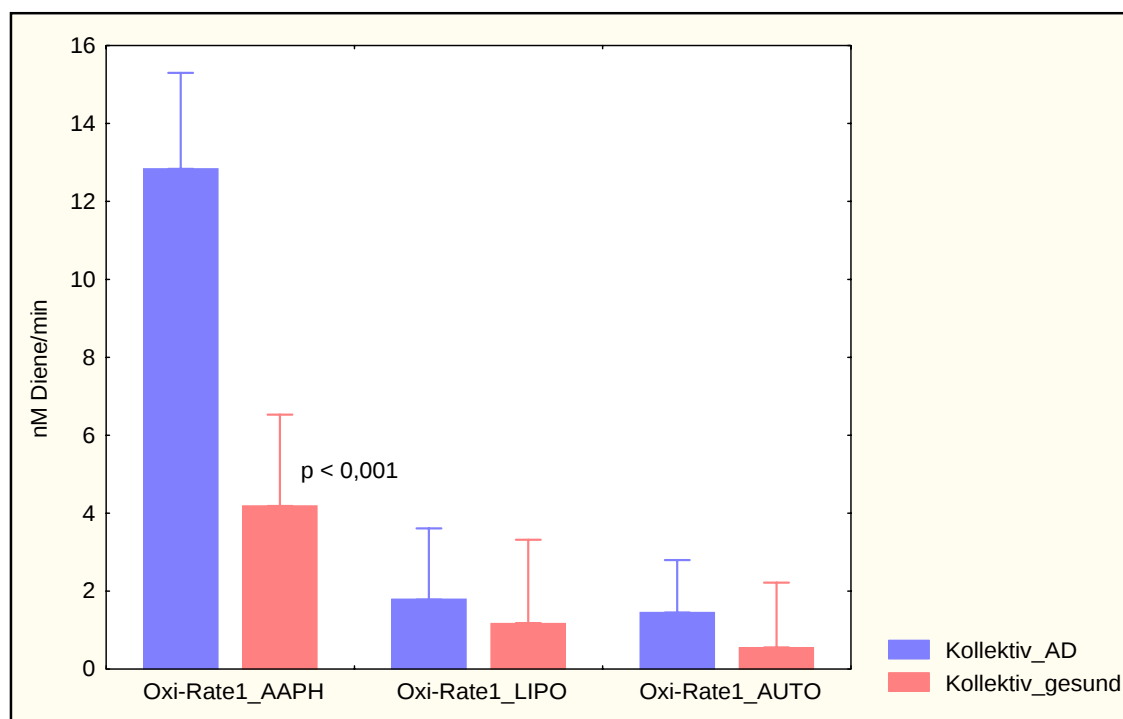
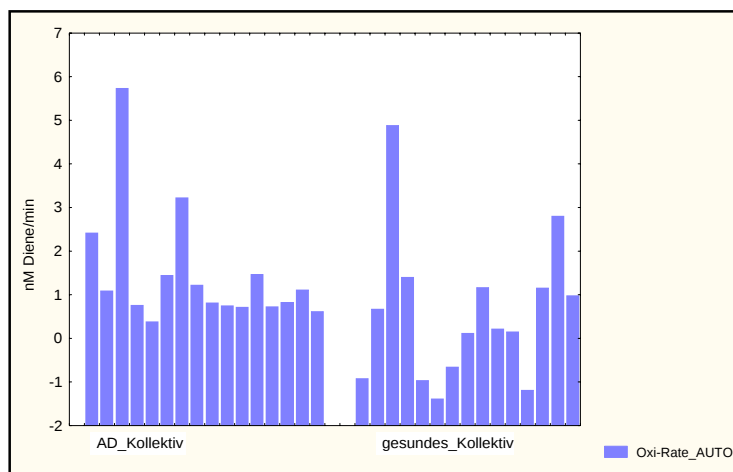


Abbildung 15: Oxidationsraten im Plasma unter verschiedenen Bedingungen

Tabelle 12: Oxidationsraten im Plasma (nM Diene/min)

Variable	Mittelwert + Stdabw. AD_Kollektiv	Mittelwert + Stdabw. gesundes Kollektiv	N (AD)	N (gesund)	p
Oxi-Rate_AAPH	12,84 ± 2,46	4,19 ± 2,35	16	25	< 0,001
Oxi-Rate_LIPO	1,79 ± 1,82	1,18 ± 2,14	16	15	0,401
Oxi-Rate_AUTO	1,45 ± 1,35	0,56 ± 1,66	16	15	0,109

3.1.2 Liquor

Im Liquor des AD-Gesamtkollektivs wurden neben der Konzentration der Antioxidantien Ascorbat und Tocopherol (α und γ) die Konzentration und Zusammensetzung der Fettsäuren sowie die Oxidationskinetik ermittelt.

Tabelle 13: Liquor-Parameter

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. AD_Kollektiv	Mittelwert $\pm$ Stdabw. gesundes Kollektiv	N (AD)	N (gesund)	p
Ascorbat (μ M)	161,98 $\pm$ 47,31	220,48 $\pm$ 49,44	27	10	0,002
α -Tocopherol (nM)	48,90 $\pm$ 19,48	59,10 $\pm$ 31,15	26	10	0,244
γ -Tocopherol (nM)	6,92 $\pm$ 1,36	6,5 $\pm$ 3,6 *	26	22*	--

*Kontrollwerte für γ -Tocopherol aus Vatassery et. al, 1991

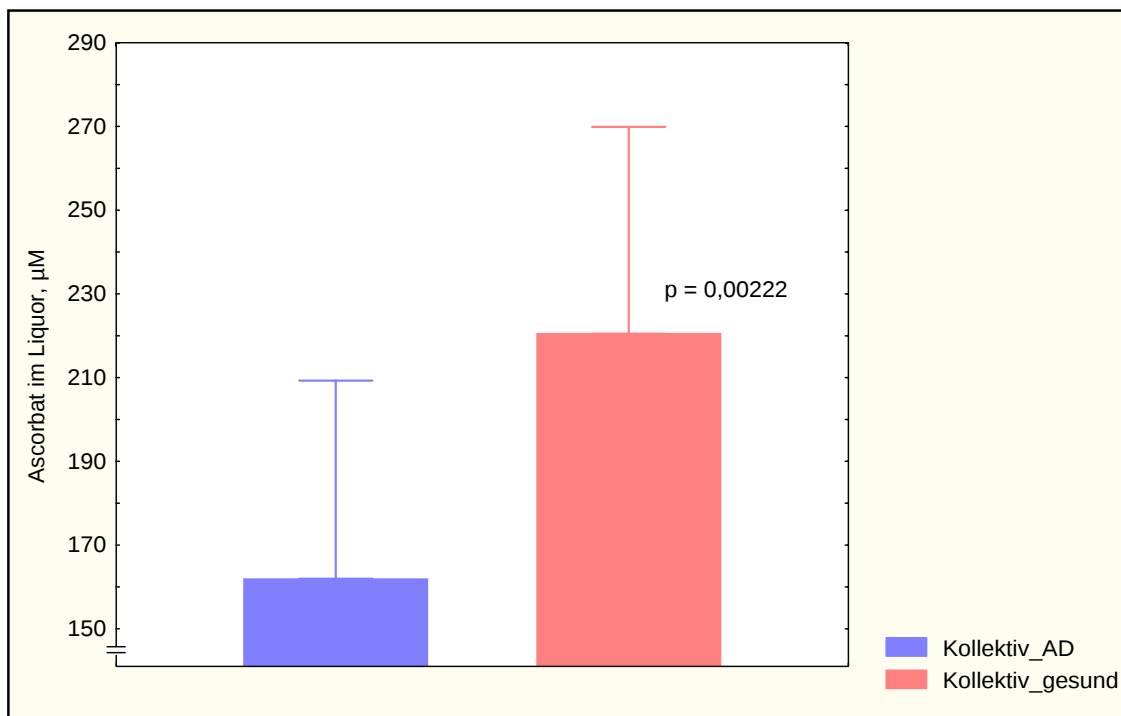


Abbildung 16: Ascorbat im Liquor

Ascorbat

Der Vergleich der **Ascorbat**-Konzentration im Liquor zeigt, wie im Plasma eine statistisch signifikante Differenz.

Während der Mittelwert des AD-Kollektivs 161,98 $\pm$ 47,31 μ M beträgt, ist er beim Vergleichs-Kollektiv der Gesunden mit 220,48 $\pm$ 49,44 μ M deutlich höher. Der p-Wert beträgt p=0,002.

α -Tocopherol

Die Konzentration von **α -Tocopherol** im Liquor zeigt eine weniger klare Differenz. Der Mittelwert des AD-Kollektivs liegt bei $48,90 \pm 19,48$ nM. Etwas höher ist dagegen der Normalwert der Gesunden mit $59,10 \pm 31,15$ nM.

Fettsäuren

Die Bestimmung der Fettsäuren erfolgte gaschromatographisch wie beschrieben. Die Fettsäure-Fractionen im Liquor (TFA, SFA, MUFA, PUFA sowie SFA%, MUFA%, PUFA%) wurden auf folgende Weisen errechnet:

Tabelle 14: Erfassung der Fettsäuren im Liquor

SFA	16:0 (Palmitic), 18:0 (Stearic)
MUFA	18:1 n-9 (Oleic), 18:1 n-7 (Vaccenic)
PUFA	18:2 n-6 (Linoleic), 20:4 n-6 (Arachidonic)
TFA	SFA + MUFA + PUFA
SFA%	SFA/TFA * 100
MUFA%	MUFA/TFA * 100
PUFA%	PUFA/TFA * 100

Der Vergleich der Fettsäure-Muster im Liquor führt zu folgendem Ergebnis:

Tabelle 15: Prozentuale Anteile der Fettsäure-Fractionen im Liquor (%)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. AD_Kollektiv	Mittelwert $\pm$ Stdabw. gesundes Kollektiv	N (AD)	N (gesund)	p
SFA%	53,67 $\pm$ 4,06	47,67 $\pm$ 4,07	27	10	0,0003
MUFA%	34,24 $\pm$ 4,90	36,86 $\pm$ 4,40	27	10	0,1472
PUFA%	11,94 $\pm$ 2,75	15,47 $\pm$ 3,46	27	10	0,0027

SFA% ist beim AD-Kollektiv gegenüber den Werten der Gesunden signifikant um 12,6% erhöht, während PUFA% signifikant um 22,8% erniedrigt ist. MUFA% differiert nur gering.

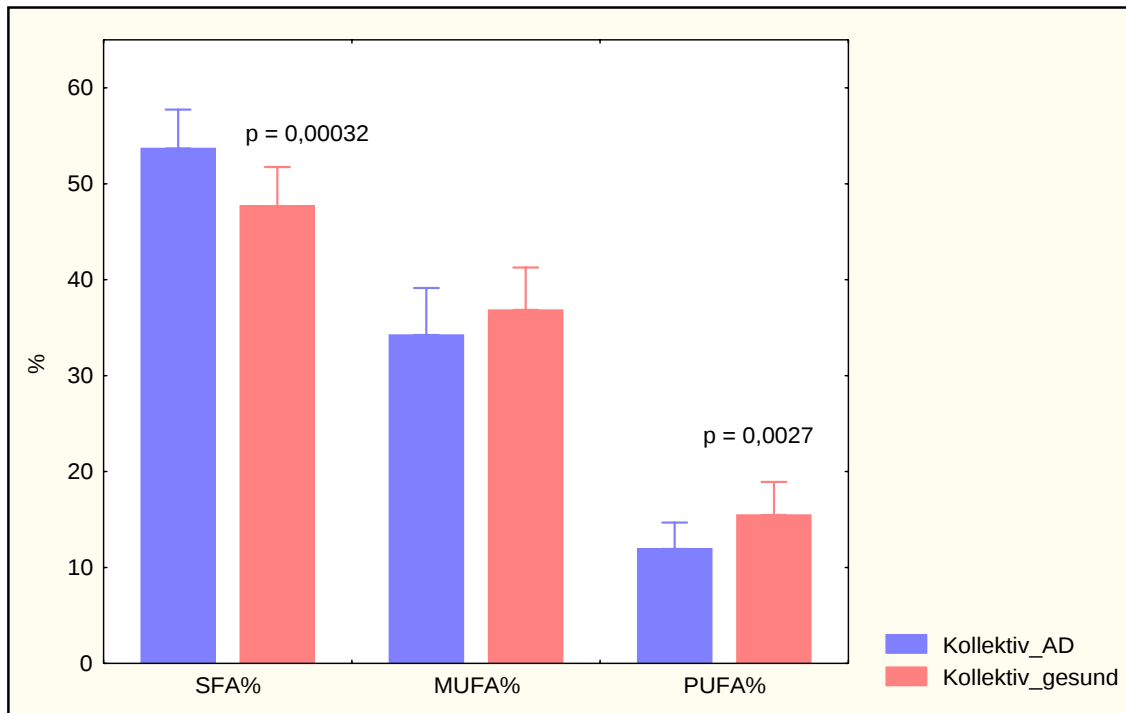


Abbildung 17: Prozentuale Anteile der Fettsäuren im Liquor

Oxidationskinetik im Liquor

Analog zu den Messungen der Oxidationskinetik im Plasma, wird auch im Liquor die Akkumulation konjugierter Diene, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm gemessen wird, als Maß für die stattfindenden Oxidationsvorgänge genommen.

Die Absorptionskurven des Liquors unterscheiden sich von denen des Plasma. Statt eines linear ansteigenden Verlaufs weisen sie drei verschiedene Abschnitte auf:

1. Die erste Phase, auch **lag phase** genannt, zeigt eine langsame Bildung von konjugierten Dien
2. Die zweite Phase, auch **propagation phase** / Akkumulationsphase genannt, entspricht der schnellen, ungehemmten Entstehung primärer Oxidationsprodukte
3. Die dritte Phase, auch **plateau-phase** genannt, in der die Steigung der Absorption mit der Zeit deutlich abnimmt, ist bedingt durch das allmähliche Überwiegen der Zerfallsprozesse der konjugierten Diene

Chelatoren wie EDTA inhibieren dagegen die Oxidation komplett. Es ist daher bei den betreffenden Oxidationskurven kein dreiphasiger Verlauf zu sehen.

Zur Auswertung der Oxidationskinetik der Liquor-Proben werden vier Parameter bestimmt. Dies sind die Steigungen sowie die Dauer der **lag-** und der **propagation phase**. Die Bestimmung der Parameter erfolgt über die Errechnung der Regressionsgeraden nach der allgemeinen Geradengleichung: $y = ax + b$ für die linearen Bereiche der jeweiligen Teilabschnitte. Der Steigungsfaktor a ist dabei ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit (dc/dt) in dieser Phase. Die Dauer der jeweiligen Phase wird aus den Schnittpunkten der Regressionsgeraden ermittelt.

Im folgenden seien beispielhaft zwei Oxidationskurven abgebildet, ein Graph unter AAPH-Katalyse und ein Graph unter Autooxidation. Leider waren die Verläufe nicht bei allen Patienten so regelhaft wie hier.

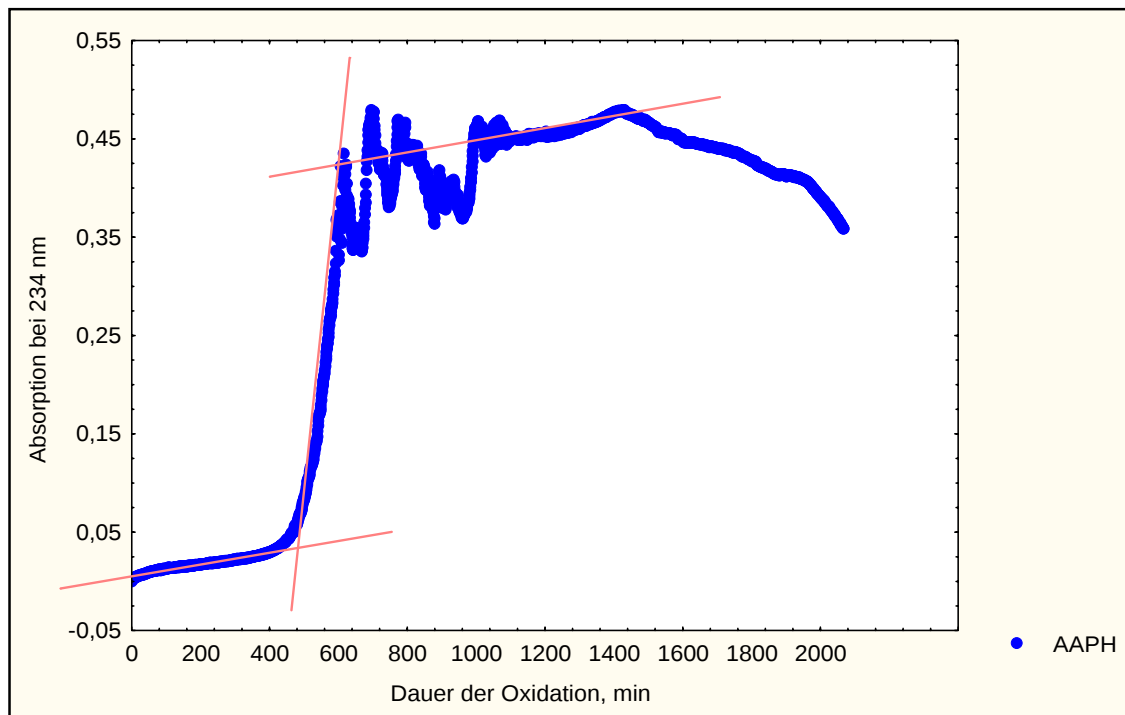


Abbildung 18: Oxidationskurve unter AAPH-Katalyse

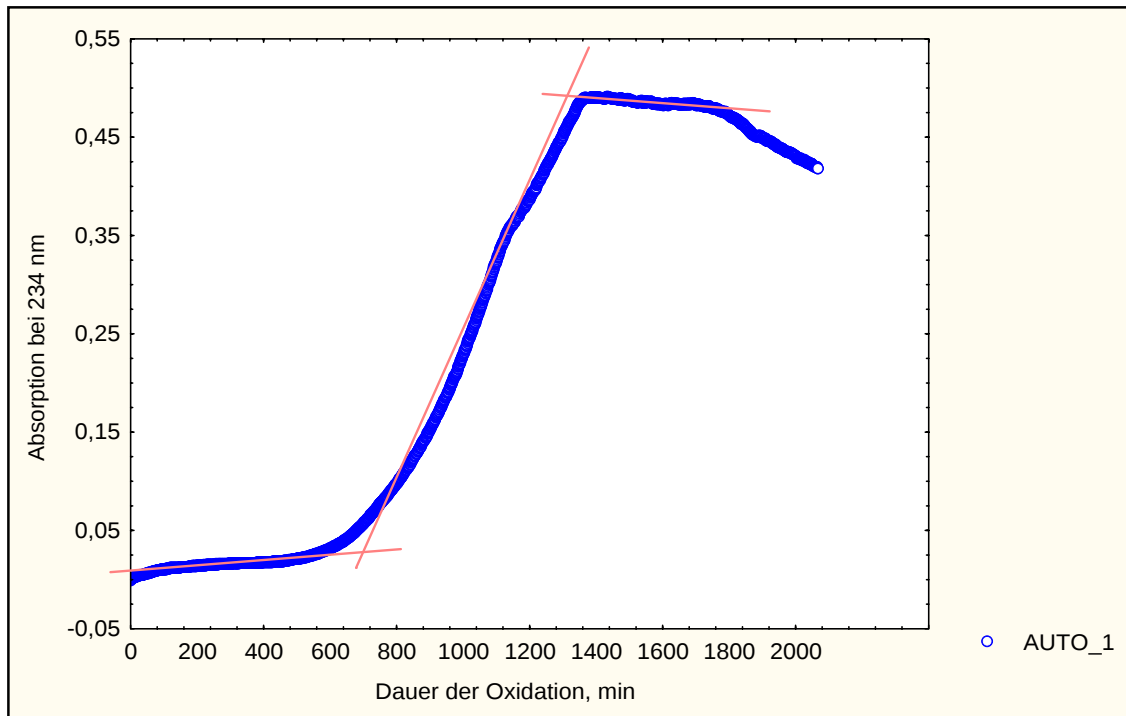


Abbildung 19: Oxidationskurve bei Autooxidation

Tabelle 16: Oxidationskinetik im Liquor des AD-Kollektivs:

Variable	N	Mittelwert $\pm$ Stdabw.	Legende:
lag-Oxi-Rate_AAPH	26	$0,29 \pm 1,17$	- lag-Oxi-Rate = Oxidationsrate der lag-Phase
prop-Oxi-Rate_AAPH	26	$47,35 \pm 31,71$	- prop-Oxi-Rate = Oxidationsrate der propagation-Phase
lag-Time_AAPH	26	$596,17 \pm 153,90$	- lag-Time = Dauer der lag-Phase
prop-Time_AAPH	26	$242,17 \pm 111,90$	- prop-Time = Dauer der propagation-Phase
lag-Oxi-Rate_AUTO	26	$0,67 \pm 1,14$	
prop-Oxi-Rate_AUTO	26	$35,98 \pm 38,53$	
lag-Time_AUTO	26	$673,33 \pm 267,42$	
prop-Time_AUTO	26	$322,07 \pm 167,35$	

Die Oxidationsdaten des gesunden Vergleichskollektivs sind aufgrund anderer Meßbedingungen nicht mit denen des AD-Kollektivs vergleichbar.

Betrachtet man die zeitliche Dauer der Phasen bei AAPH-Katalyse und bei Autooxidation, so wird deutlich, daß sowohl die lag-Phase als auch die propagation-Phase bei Autooxidation im Vergleich zur AAPH-katalysierten Oxidation verlängert sind.

3.2 Ergebnisse der Supplementation

3.2.1 Bestimmung der hydrophilen Antioxidantien in Plasma und Liquor

Plasma

Von folgenden hydrophilen Antioxidantien des Plasma wurden die Konzentrationen bestimmt: Ascorbat, Urat, Bilirubin und SH-Gruppen.

Ascorbat

Die Bestimmung der Ascorbat-Konzentration im Plasma ($n = 8$) erfolgte photometrisch (siehe Material und Methoden). Der Ascorbat-Mittelwert zeigt einen statistisch signifikanten Anstieg. Während der Mittelwert vor der Supplementation $35,70 \pm 9,41 \mu\text{M}$ betrug, befindet er sich nach der Supplementation bei $62,32 \pm 23,22 \mu\text{M}$ ($p = 0,022$).

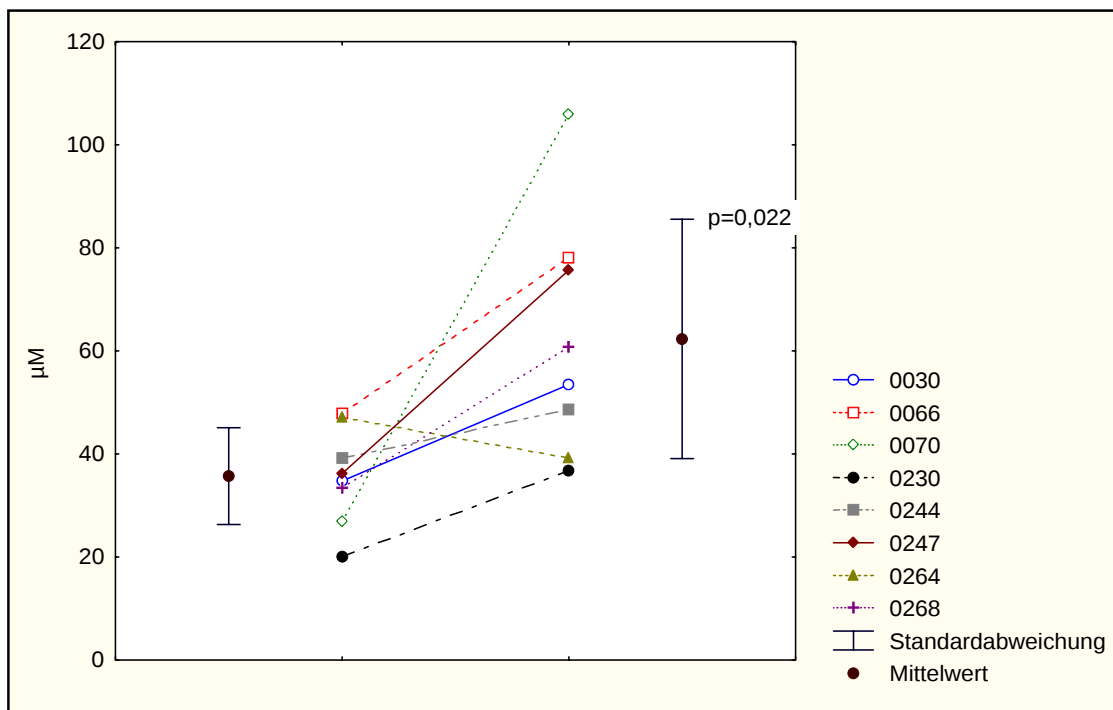


Abbildung 20: Ascorbat-Konzentration im Plasma (μM); abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung sowie die Einzelkonzentrationen ($n = 9$)

Wie bereits im Kapitel „Material und Methoden“ erwähnt, erhielt der Patient mit der Code-Nr. 0264 schon vor Beginn der Supplementation täglich 500 mg Vitamin C sowie 200 mg Vitamin E oral über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr bis unmittelbar vor Beginn der Studie. Dies erklärt die abweichende Tendenz der Ascorbat- und α -Tocopherol-Werte im Laufe der Supplementation.

Urat

Die **Urat**-Konzentrationen im Plasma bleiben nahezu unverändert. Der Mittelwert zeigt nur einen minimalen Anstieg von $350,82 \pm 43,20 \mu\text{M}$ auf $351,7889 \pm 50,18 \mu\text{M}$ ($p = 0,95$).

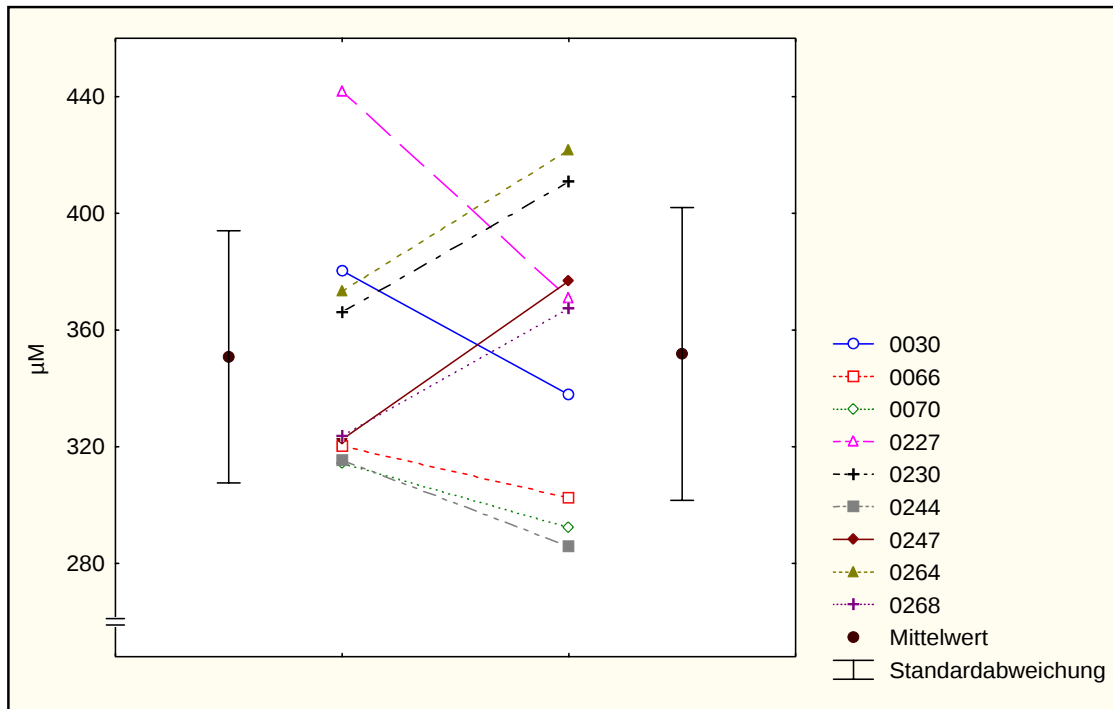
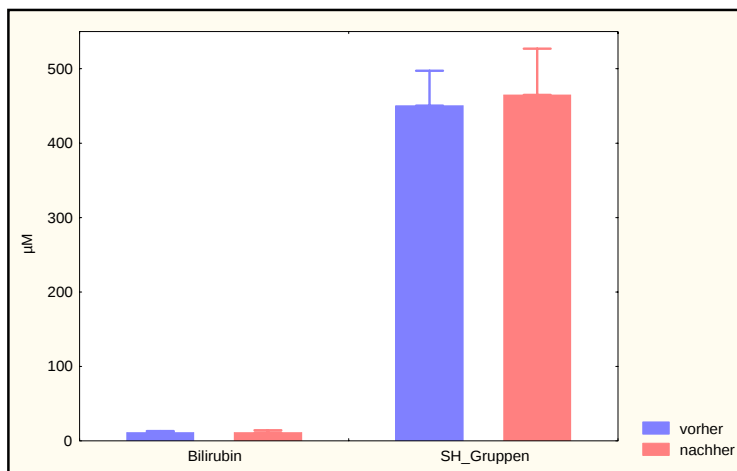


Abbildung 21: Urat-Konzentration im Plasma (µM); abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung sowie die Einzelkonzentrationen ($n = 9$)

Auch die Plasmakonzentrationen von Bilirubin und der SH-Gruppen zeigen keine statistisch signifikanten Veränderungen. Während der Mittelwert der **SH-Gruppen**-Konzentration leicht um 3,2% von $450,41 \pm 46,83 \mu\text{M}$ auf $464,83 \pm 60,98 \mu\text{M}$ ansteigt ($p = 0,537$), ist beim Mittelwert der **Bilirubin**-Konzentration ein Rückgang um 3,2% zu beobachten ($11,15 \pm 2,06 \mu\text{M}$ vs. $10,81 \pm 3,34 \mu\text{M}$, $p = 0,711$).



um 3,2% von $450,41 \pm 46,83 \mu\text{M}$ auf $464,83 \pm 60,98 \mu\text{M}$ ansteigt ($p = 0,537$), ist beim Mittelwert der **Bilirubin**-Konzentration ein Rückgang um 3,2% zu beobachten ($11,15 \pm 2,06 \mu\text{M}$ vs. $10,81 \pm 3,34 \mu\text{M}$, $p = 0,711$).

Abbildung 22:
Bilirubin und SH-Gruppen

Tabelle 17: Plasma-Konzentration von Urat, Bilirubin und SH-Gruppen (μM)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
Ascorbat	35,70 $\pm$ 9,41	62,32 $\pm$ 23,22	8	0,022
Urat	350,82 $\pm$ 43,20	351,79 $\pm$ 50,18	9	0,952
Bilirubin	11,15 $\pm$ 2,06	10,81 $\pm$ 3,34	9	0,711
SH-Gruppen	450,41 $\pm$ 46,83	464,83 $\pm$ 60,98	9	0,537

Liquor

Im Liquor wurde aus der Gruppe der hydrophilen Antioxidantien lediglich Ascorbat bestimmt. Analog zu der Ascorbat-Bestimmung im Plasma erfolgt diese ebenso photometrisch. Die Konzentration von **Ascorbat** im Liquor zeigt einen statistisch signifikanten Anstieg um 16,8%. Der Mittelwert erhöht sich von anfangs 166,56 $\pm$ 66,96 μM auf 194,49 $\pm$ 55,68 μM . Dieses entspricht einem p-Wert von $p = 0,013$.

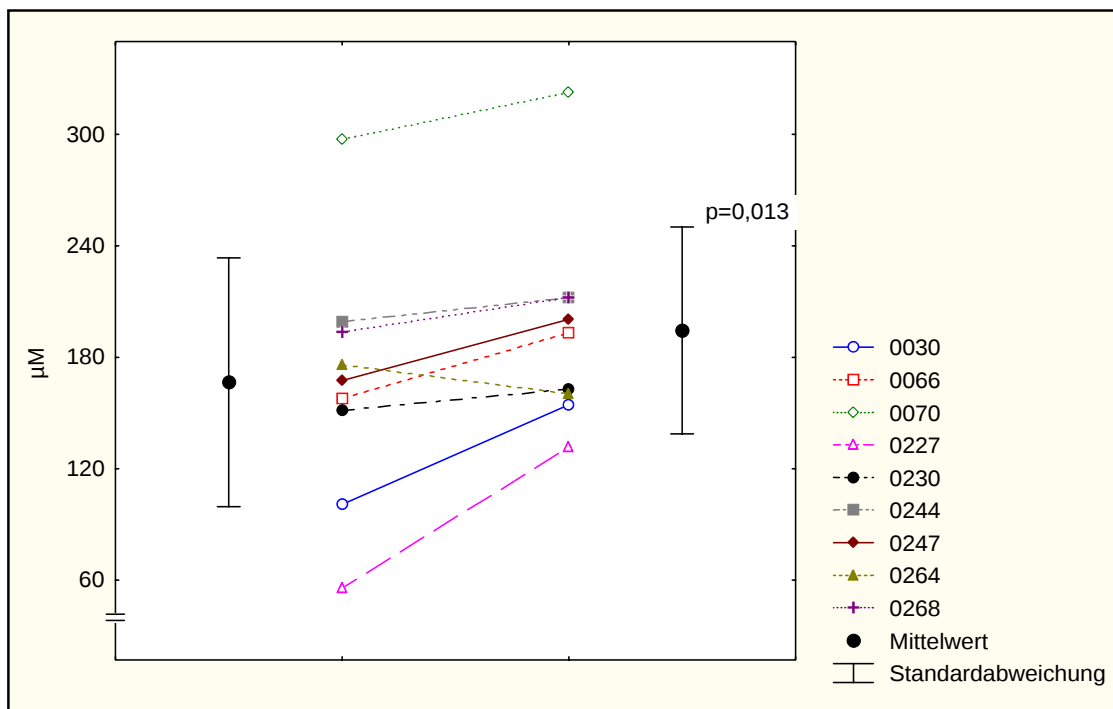


Abbildung 23: Konzentration von Ascorbat im Liquor (μM); abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung sowie die Einzelkonzentrationen ($n = 9$)

3.2.2 Bestimmung der lipophilen Antioxidantien

Plasma

Konzentration der Tocopherole

Die Bestimmung der Tocopherole umfaßt α - und γ -Tocopherol. Die Tocopherole werden als erste Substanzen von der chromatographischen Säule eluiert und bei geringer Empfindlichkeit der Meßzelle detektiert. Da der γ -Tocopherol-Peak hierbei zwischen denen von α - und δ -Tocopherol liegt, kann die exakte Integration Schwierigkeiten bereiten.

Die Supplementation von Vitamin E und Vitamin C führte zu einem klaren, statistisch signifikanten Anstieg der α -Tocopherol-Konzentration im Plasma.

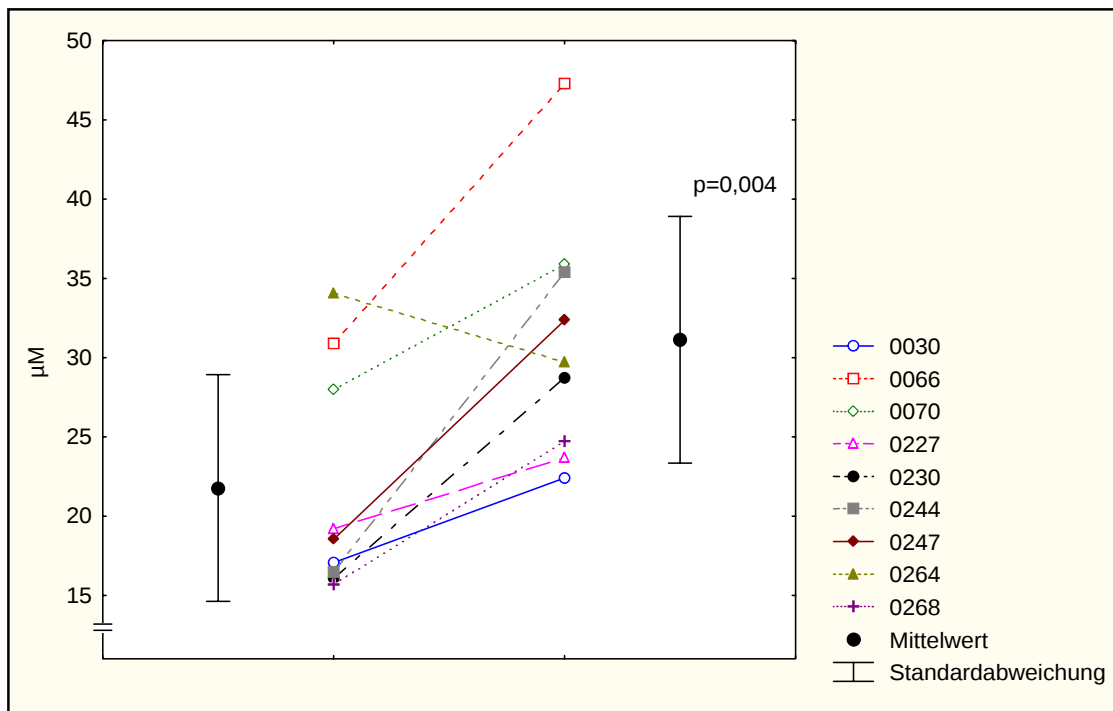


Abbildung 24: α -Tocopherol im Plasma (μM); abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die Einzelkonzentrationen

Während der Mittelwert der **α -Tocopherol**-Konzentration ($n = 9$) im Plasma vor der Supplementation $21,78 \pm 7,15 \mu\text{M}$ betrug, konnte nach der Supplementation ein signifikanter Anstieg um über 40% (42,93%) auf einen neuen Mittelwert von $31,13 \pm 7,78 \mu\text{M}$ ($p = 0,004$) verzeichnet werden.

Dagegen zeigt der Mittelwert der **γ -Tocopherol** Plasma-Spiegel ($n = 8$) im Verlauf der Supplementation keinen entsprechenden Anstieg. Er verringert sich sogar deutlich. Während der Mittelwert vor der Supplementation noch $3,93 \pm 1,79 \mu\text{M}$ betrug, liegt er nach der Supplementation bei $2,62 \pm 1,33 \mu\text{M}$ ($p = 0,154$).

Abbildung 25:
 γ -Tocopherol im Plasma (μM)

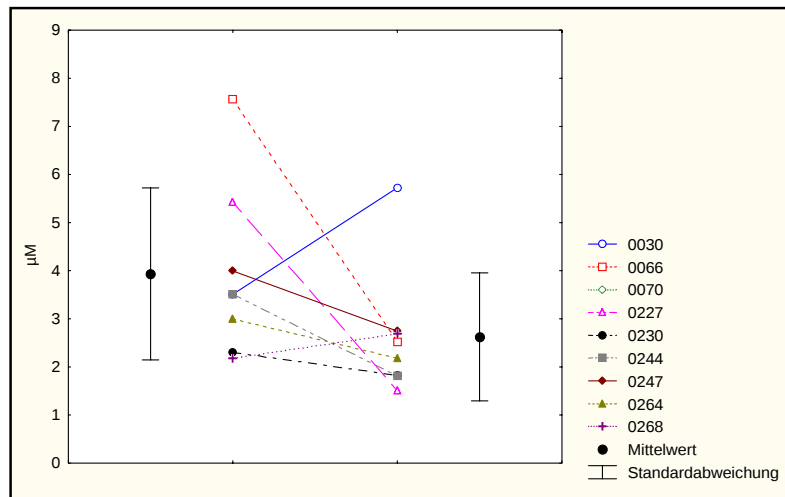


Tabelle 18: Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien im Plasma (μM)

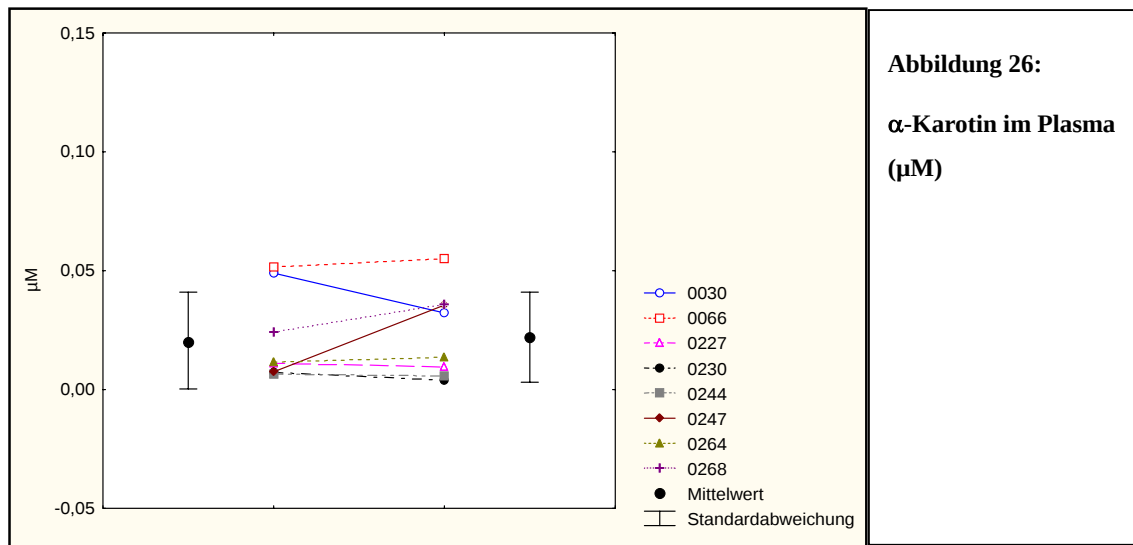
Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementation	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementation	N	p
α -Tocopherol	21,78 $\pm$ 7,15	31,13 $\pm$ 7,78	9	0,004
γ -Tocopherol	3,93 $\pm$ 1,79	2,62 $\pm$ 1,33	8	0,154
α -Karotin	0,021 $\pm$ 0,019	0,024 $\pm$ 0,183	8	0,553
β -Karotin	0,331 $\pm$ 0,417	0,373 $\pm$ 0,444	9	0,082
Ubichinol-10	0,602 $\pm$ 0,348	0,584 $\pm$ 0,398	9	0,813

Neben den Tocopherolen wurden an lipophilen Antioxidantien im Plasma zusätzlich noch die Konzentration der α - und β -Karotine bestimmt sowie die Ubichinol-10-Konzentrationen.

Karotine

Weder die Plasmakonzentrationen der α -Karotine noch die der β -Karotine ($n = 9$) zeigen statistisch signifikante Veränderungen im Verlauf der Studie. Der Mittelwert von **α -Karotin**

zeigt eine leichte Zunahme um 13,5% ($0,021 \pm 0,02$ vs. $0,024 \pm 0,02$, $p = 0,553$), deutlicher der Anstieg der **β -Karotine** ($0,33 \pm 0,42$ vs. $0,37 \pm 0,44 \mu\text{M}$; $p = 0,082$) mit 26,9%.



Ubichinol-10

Die **Ubichinol-10**-Konzentration im Plasma ($n = 9$) zeigt minimale Veränderungen. Der Mittelwert nimmt von $0,60 \pm 0,35$ auf $0,58 \pm 0,40 \mu\text{M}$ ab ($p = 0,813$).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß lediglich die Konzentrationen von α -Tocopherol im Plasma statistisch signifikante Veränderungen zeigen, während die Konzentrationen von γ -Tocopherol, α - und β -Karotin sowie von Ubichinol-10 im wesentlichen gleich bleiben.

Liquor

Im Liquor beschränkt sich die Bestimmung der lipophilen Antioxidantien auf die Tocopherole. Gemessen werden α - und γ -Tocopherol ($n = 9$).

Es zeigt sich ein dem Plasma ähnliches Bild. Während die Konzentrationen von α -Tocopherol einen deutlichen, statistisch signifikanten Anstieg verzeichnen, sind bei γ -Tocopherol keine signifikanten Veränderungen zu beobachten.

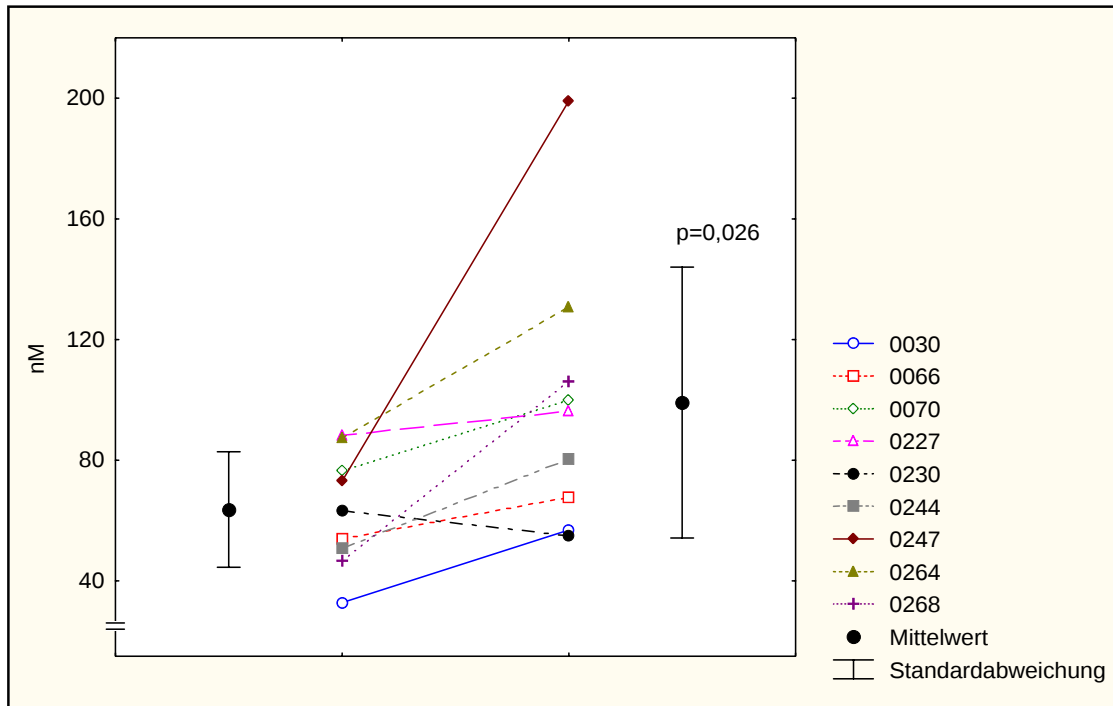


Abbildung 27: α -Tocopherol im Liquor (nM)

Zu erkennen ist zunächst die deutlich geringere Konzentration der Tocopherole im Liquor im Vergleich zum Plasma (nM-Bereich statt μ M-Bereich). Wie in Abbildung 27 zu sehen, führt die Supplementation von Vitamin E und C zu einem deutlichen, statistisch signifikanten Anstieg der **α -Tocopherol**-Konzentration im Liquor um 55,73% ($63,66 \pm 19,14$ vs. $99,13 \pm 44,89$ nM; $p = 0,026$).

Die Konzentration von **γ -Tocopherol** im Liquor ($n = 7$) zeigt ebenfalls im Mittel einen statistisch signifikanten Anstieg um 16,2% ($6,92 \pm 0,84$ vs. $8,03 \pm 1,00$ nM; $p = 0,024$).

Tabelle 19: Konzentrationen von α - und γ -Tocopherol im Liquor (nM)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
α -Tocopherol	63,7 $\pm$ 19,1	99,1 $\pm$ 44,9	9	0,026
γ -Tocopherol	6,92 $\pm$ 0,84	8,03 $\pm$ 1,00	7	0,024

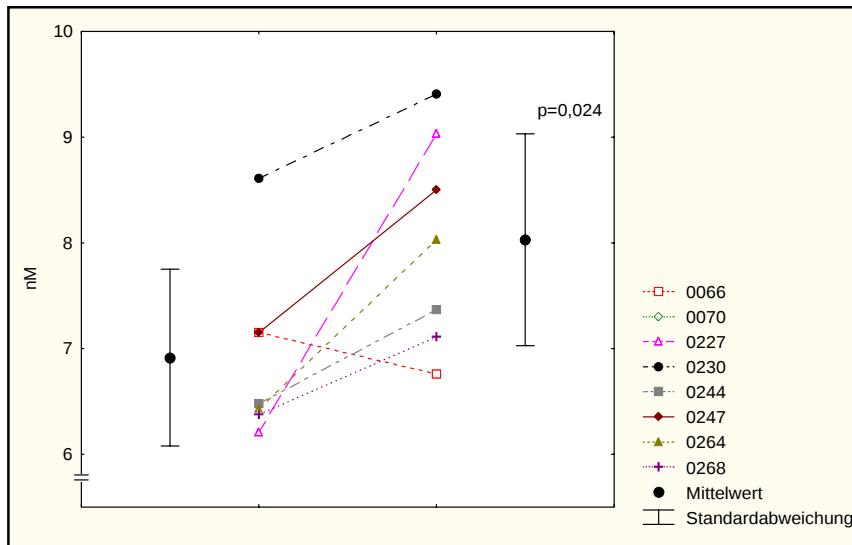


Abbildung 28:
Konzentration von
 γ -Tocopherol im
Liquor (nM)
abgebildet sind Mit-
telwerte und
Standardabweichungen
sowie die Einzelkon-
zentrationen (n = 7).

3.2.3 Fettsäuren und Cholesterin

Plasma

Fettsäuren

Die Supplementation führt zu keiner signifikanten Veränderung der Gesamtkonzentration der Fettsäuren (TFA). Die Konzentration an TFA sinkt von $1186,91 \pm 276,79$ mg/dl auf $1128,03 \pm 250,13$ mg/dl. Das entspricht einem p-Wert von $p = 0,169$.

Tabelle 20: Konzentrationen der Fettsäurefraktionen im Plasma (mg/dl)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
TFA	1186,91 $\pm$ 276,79	1128 $\pm$ 250,13	9	0,169
SFA	405,52 $\pm$ 104,03	388,46 $\pm$ 94,02	9	0,384
MUFA	329,37 $\pm$ 108,84	315,87 $\pm$ 102,01	9	0,364
PUFA	452,02 $\pm$ 88,19	423,71 $\pm$ 77,26	9	0,020

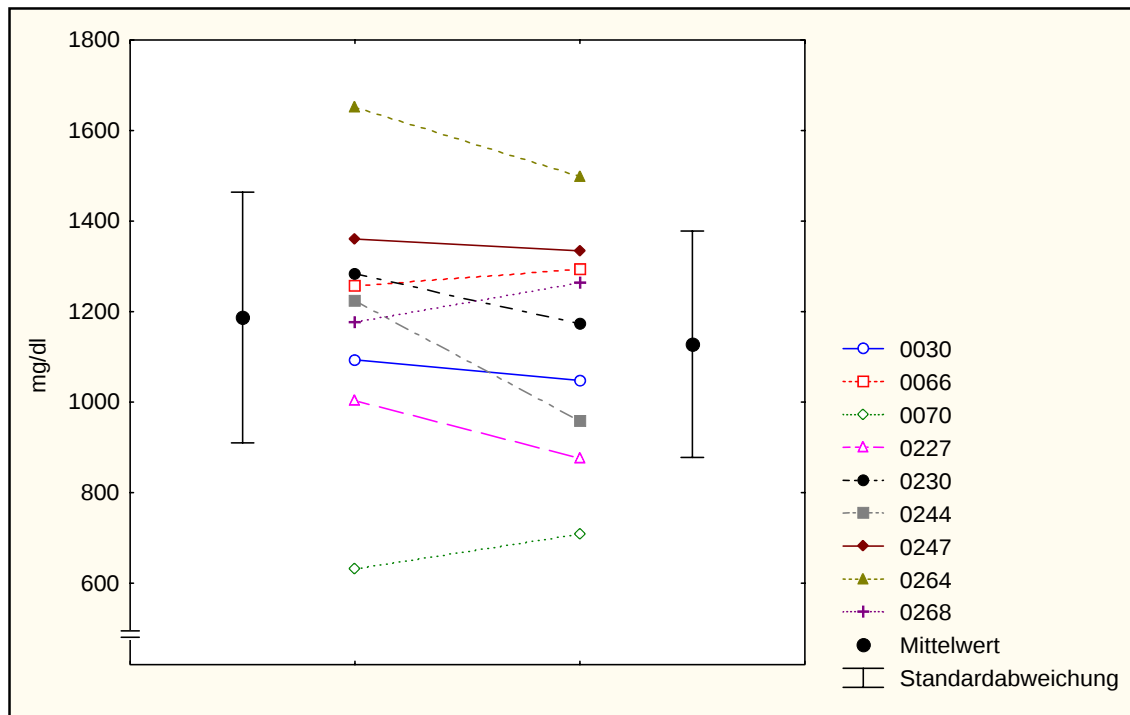
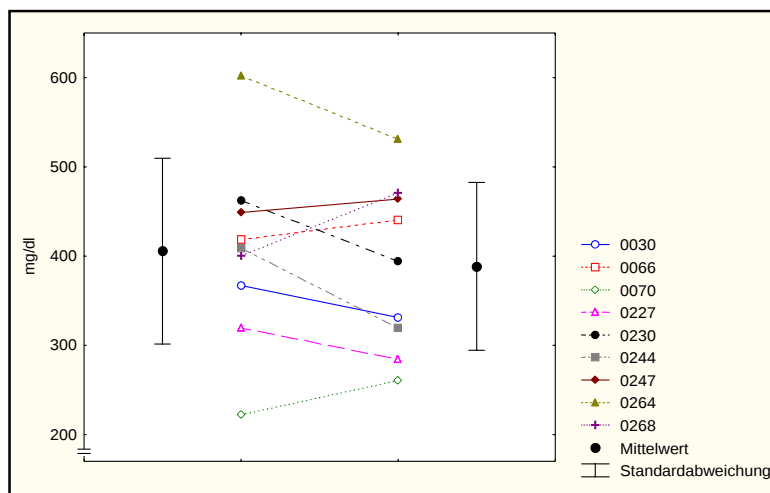


Abbildung 29: Gesamtkonzentration der Fettsäuren, TFA (mg/dl) vor und nach der Supplementation; abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung sowie die Einzelkonzentrationen (n = 9)

Die Bestimmung der einzelnen **Fettsäure-Faktionen** ergab folgende Ergebnisse:

Die Werte der SFA-Konzentration zeigen nur eine leichte Abnahme ($405,52 \pm 104,03$ mg/dl vs. $388,46 \pm 94,02$ mg/dl; $p = 0,384$). Die Konzentrationen der einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) zeigt ebenfalls keine signifikanten Veränderungen. Die Mittelwerte vor und nach



der Supplementierung bleiben annähernd gleich ($329,37 \pm 108,84$ mg/dl vs. $315,87 \pm 102,02$ mg/dl; $p = 0,364$).

**Abbildung 30:
Konzentration der gesättigten
Fettsäuren (SFA)**

Die Spiegel der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) zeigen dagegen eine signifikante Abnahme ($p = 0,008$). Der Mittelwert verringert sich von $479,85 \pm 30,41$ mg/dl auf $446,05 \pm 41,12$ mg/dl. Das entspricht einem p-Wert von $p = 0,008$.

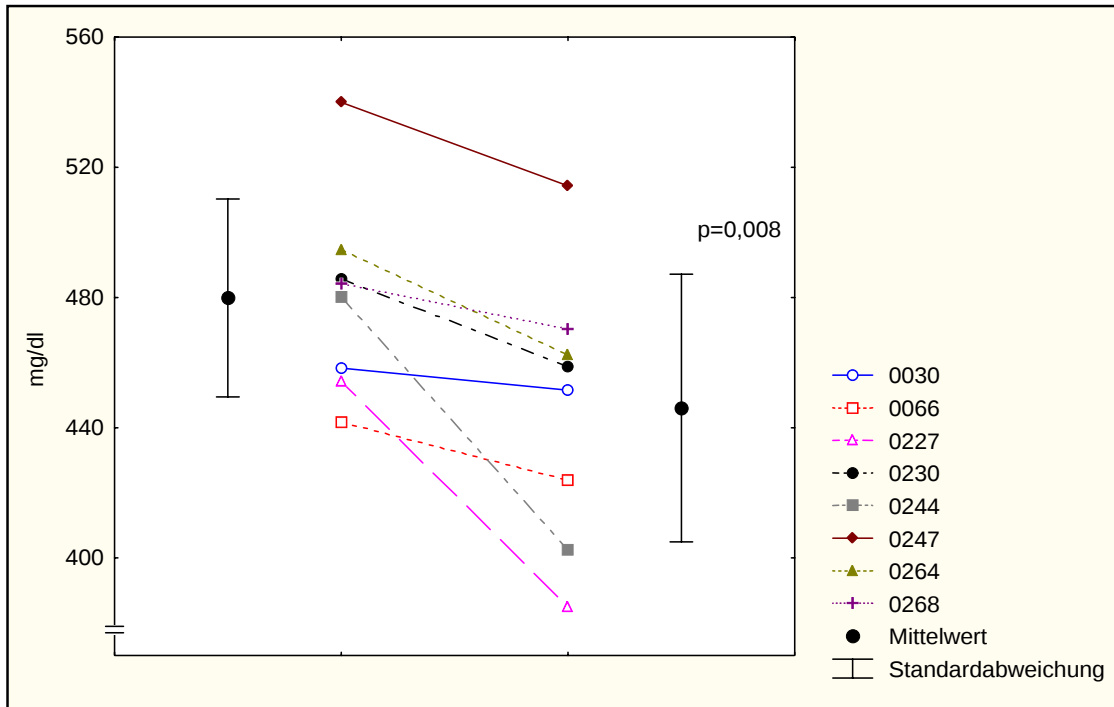


Abbildung 31: Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, PUFA (mg/dl)

Betrachtet man die prozentualen Anteile der einzelnen Fettsäure-Fractionen (SFA%, MUFA% und PUFA%), so ergeben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen durch die Supplementation.

Der Anteil der gesättigten Fettsäuren (SFA%) bleibt nahezu unverändert ($34,08 \pm 1,50$ % vs. $34,37 \pm 1,88$ %; $p = 0,652$). Entsprechendes gilt für die Anteile der einfach bzw. mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA% bzw. PUFA%). Bei

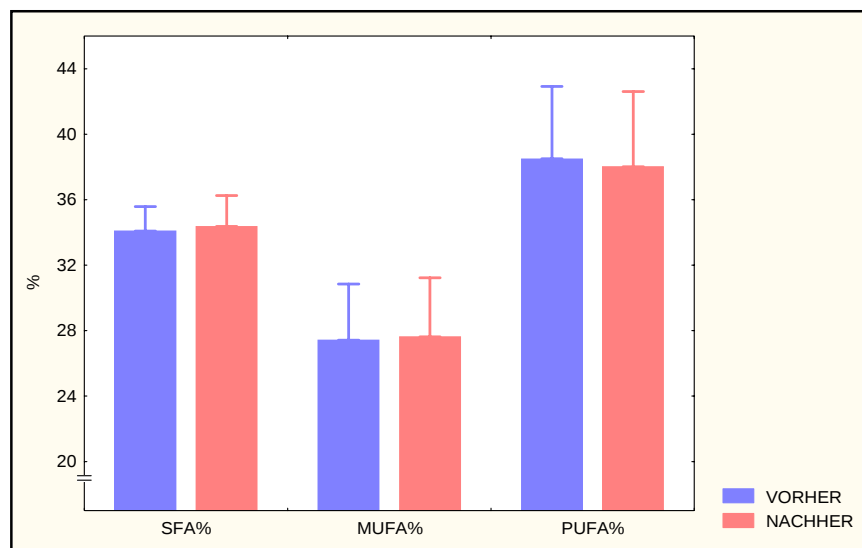


Abbildung 32: Zusammensetzung der Fettsäuren im Plasma

den einfach ungesättigten Fettsäuren gibt es einen geringen Anstieg um 0,7 % ($27,42 \pm 3,43$ % vs. $27,62 \pm 3,61$ %; $p = 0,647$) bei den mehrfach ungesättigten Fettsäuren einen leichten Rückgang um 1,27 % ($38,50 \pm 4,42$ % vs. $38,01 \pm 4,60$ %; 0,513).

Tabelle 21: Fettsäure-Zusammensetzung im Plasma (%)

Variable	Mittelwert + Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert ± Stdabw. nach Supplementierung	N	p
SFA%	$34,08 \pm 1,50$	$34,37 \pm 1,88$	9	0,652
MUFA%	$27,42 \pm 3,43$	$27,62 \pm 3,61$	9	0,647
PUFA%	$38,50 \pm 4,42$	$38,01 \pm 4,60$	9	0,513

Cholesterin

Die Bestimmung der Plasma-Cholesterinwerte ergab keine signifikanten Veränderungen. Die Mittelwerte vor und nach der Supplementierung differieren nur sehr gering ($233,00 \pm 20,43$ vs $234,22 \pm 19,42$ mg/dl; $p = 0,793$).

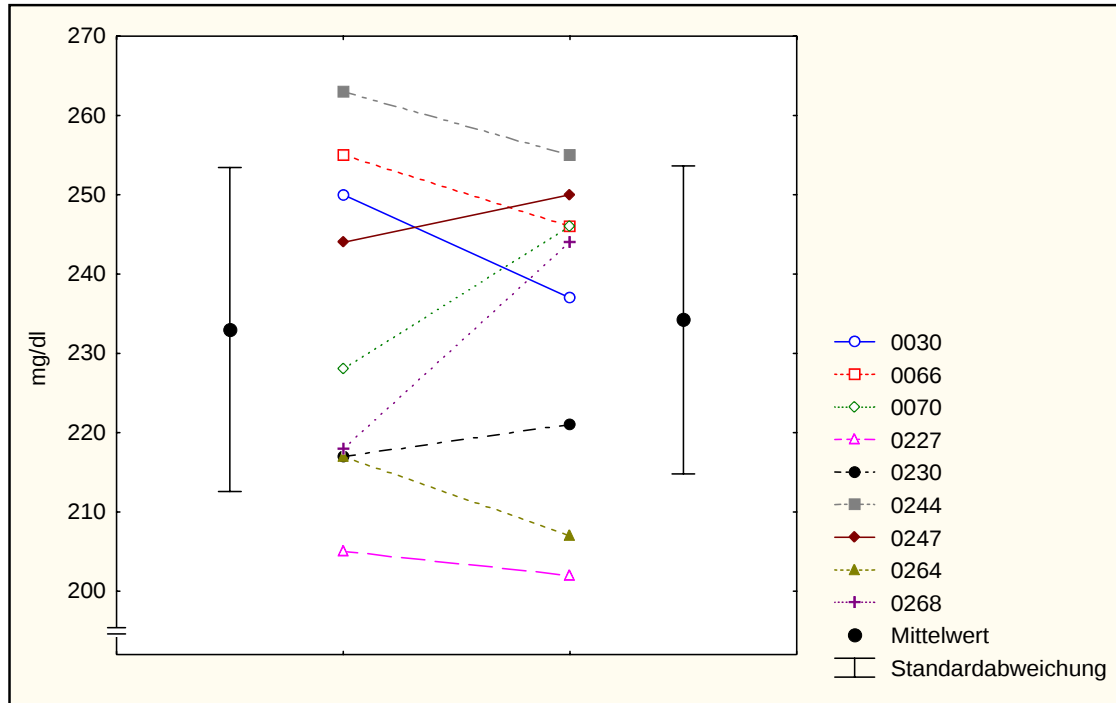


Abbildung 33: Konzentration von Cholesterin im Plasma (mg/dl)

Liquor

Fettsäuren

Wie im Plasma erfolgte die Bestimmung der Fettsäuren und des Cholesterins simultan in einer gaschromatographischen Detektion. Die Supplementation der Vitamine führte zu keinen signifikanten Veränderungen in der Fettsäuren-Zusammensetzung des Liquors.

Weder kommt es zu nennenswerten Veränderungen der Gesamt-Fettsäure-Konzentration TFA ($5,55 \pm 1,71$ vs. $5,85 \pm 2,24$ mg/l; $p = 0,515$), noch zeigen die einzelnen Fraktionen (SFA, MUFA und PUFA) signifikante Zu- oder Abnahmen in ihren totalen Konzentrationen: Die TFA nehmen um 5,4% zu, die gesättigten Fettsäuren (SFA) steigen um 12,5% ($2,81 \pm 0,81$ vs. $3,16 \pm 0,99$ mg/l; $p = 0,158$). Die einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) bleiben ebenso wie die mehrfach ungesättigten (PUFA) nahezu unverändert (MUFA: $2,11 \pm 0,63$ vs. $2,01 \pm 1,08$ mg/l, $p = 0,682$; PUFA: $0,63 \pm 0,34$ vs. $0,68 \pm 0,51$ mg/l, $p = 0,696$).

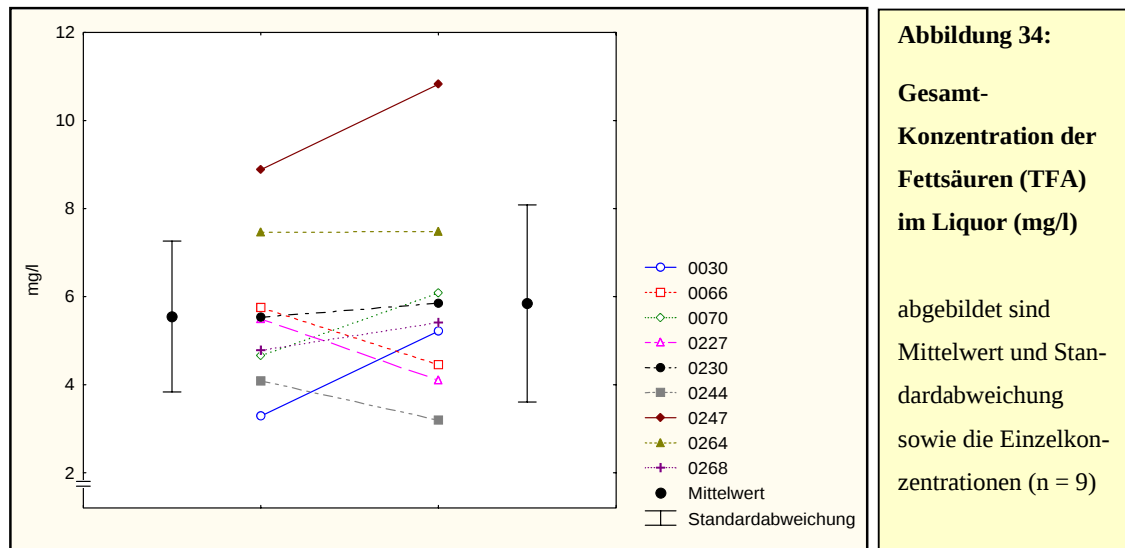


Tabelle 22: Konzentrationen der Fettsäure-Fraktionen TFA, SFA, MUFA und PUFA im Liquor (mg/l)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementation	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementation	N	p
SFA	$2,81 \pm 0,81$	$3,16 \pm 0,99$	9	0,158
MUFA	$2,11 \pm 0,64$	$2,01 \pm 1,09$	9	0,628
PUFA	$0,63 \pm 0,34$	$0,68 \pm 0,51$	9	0,696
TFA	$5,55 \pm 1,71$	$5,85 \pm 2,24$	9	0,515

Ein ähnliches Bild bieten die prozentualen Anteile der FS-Fraktonen: auch hier sind keine signifikanten Veränderungen der Fettsäure-Zusammensetzung zu entdecken. Leichte Zunahmen bei den gesättigten Fettsäuren (SFA%: $50,79 \pm 4,87$ vs. $55,94 \pm 10,03$ %, $p = 0,138$) sowie leichte Abnahmen bei den einfach gesättigten Fettsäuren (MUFA%:

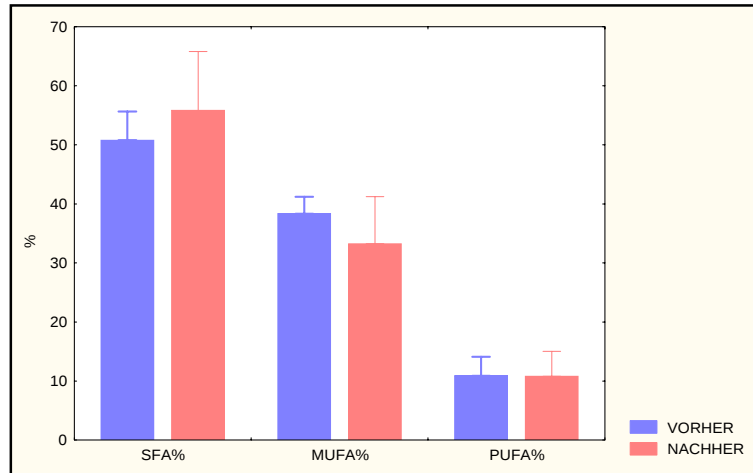


Abbildung 35: Zusammensetzung der Fettsäuren im Liquor

$38,33 \pm 2,87$ vs. $33,26 \pm 7,97$ %, $p = 0,078$). Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren bleiben unverändert (PUFA%: $10,88 \pm 3,23$ vs. $10,80 \pm 4,22$ %, $p = 0,961$). Siehe auch Abb.35.

Tabelle 23: Prozentuale Anteile der Fettsäure-Fraktonen SFA, MUFA und PUFA im Liquor (%)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
SFA%	$50,79 \pm 4,87$	$55,79 \pm 10,03$	9	0,138
MUFA%	$38,33 \pm 2,87$	$33,26 \pm 7,97$	9	0,078
PUFA%	$10,88 \pm 3,23$	$10,80 \pm 4,22$	9	0,961

Cholesterin

Statistisch signifikante Veränderungen sind bei der Cholesterin-Konzentration zu beobachten. Im Verlauf der Supplementation kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Cholesterin-Werte im Liquor um 24% ($3,07 \pm 1,04$ vs. $3,81 \pm 1,10$ mg/l).

Tabelle 24: Konzentrationen von Cholesterin im Liquor (mg/l)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
Cholesterin	$3,07 \pm 1,04$	$3,81 \pm 1,10$	9	0,003

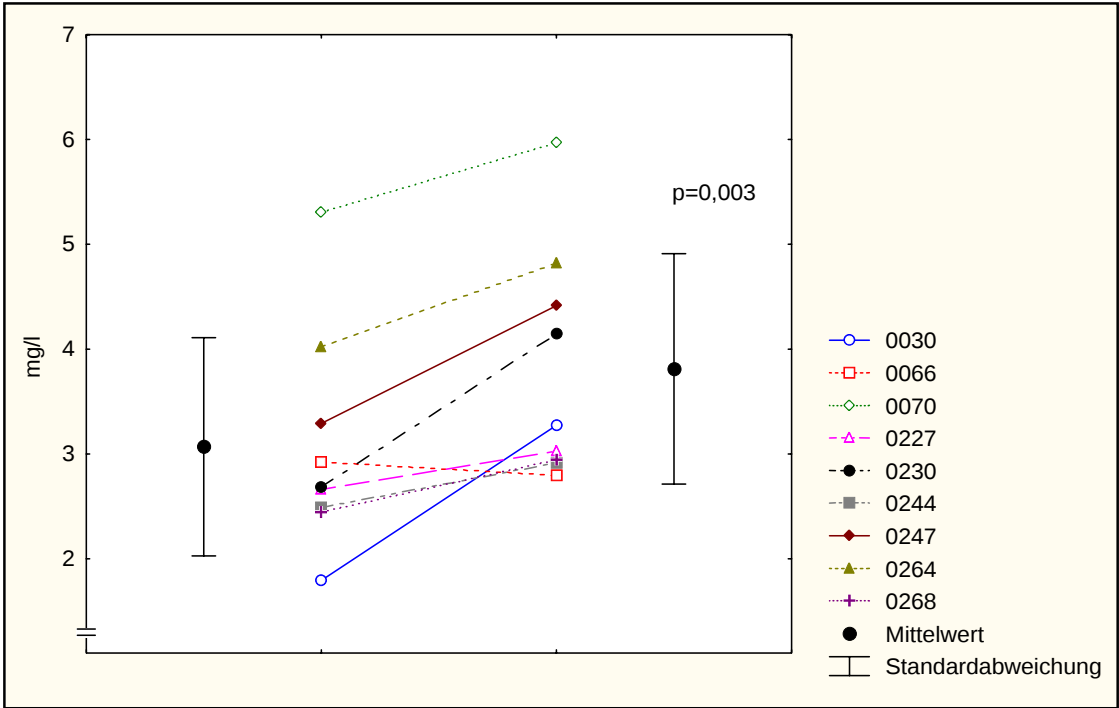


Abbildung 36: Konzentration von Cholesterin im Liquor (mg/l); abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung sowie die Einzelkonzentrationen (n = 9)

3.2.4 Oxidationskinetik im Plasma

Bei der Analyse der Oxidationskinetik im Plasma wurden für das Supplementationskollektiv neben den unkorrigierten Werten, den „Rohdaten“, zusätzlich Differenzwerte gebildet. Diese Differenz-Bildung der Plasma-Oxidationswerte führte zu folgenden korrigierten Variablen:

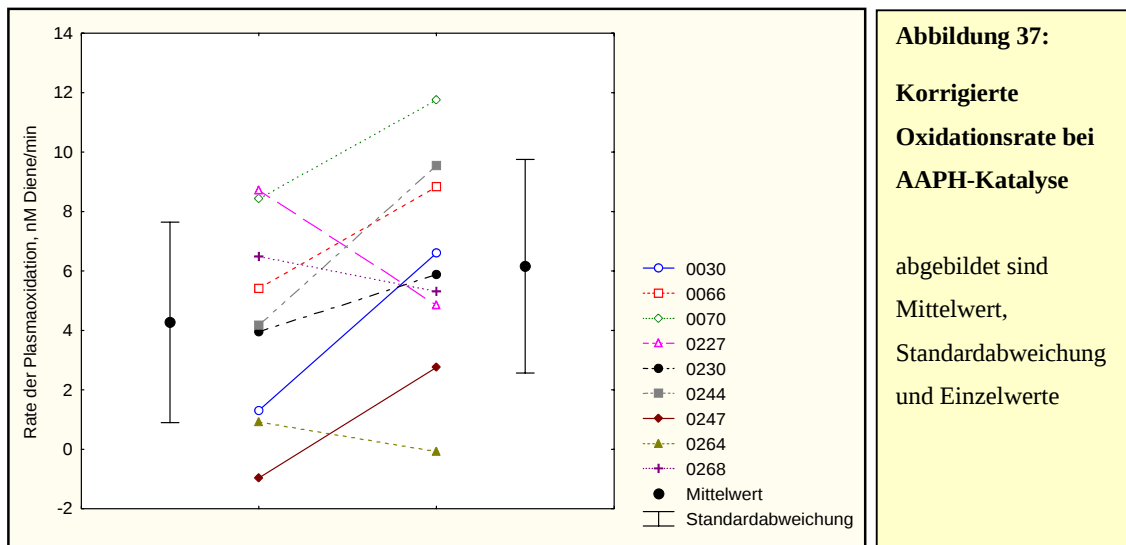
- Korrigierte Rate der Plasmaoxidation unter AAPH (nM Diene/min)
Oxi-Rate-prä AAPH_ / Oxi-Rate-post AAPH_
- Korrigierte Rate der Plasmaoxidation unter Lipoxxygenase (nM Diene/min)
Oxi-Rate-prä LIPO_ / Oxi-Rate-post LIPO_

Auf folgende Weise wurden die Differenzen gebildet:

Tabelle 25: Plasma-Oxidationsraten; Berechnung

Variable	
Oxi-Rate-prä AAPH_	R1_AAPH – K1_AAPH – R1_AUTO
Oxi-Rate-post AAPH_	R2_AAPH – K2_AAPH – R2_AUTO
Oxi-Rate-prä LIPO_	R1_LIPO – K1_LIPO – R1_AUTO
Oxi-Rate-post LIPO_	R2_LIPO – K2_LIPO – R2_AUTO

Der Vergleich der korrigierten Oxidationsraten unter AAPH-Katalyse zeigt ein uneinheitliches Bild:



Der Mittelwert steigt von $4,27 \pm 3,37$ nM/min auf $6,16 \pm 3,59$ nM/min. Das entspricht einem p-Wert von 0,115.

Der Mittelwert der korrigierten Oxidationsrate unter Katalyse von Lipoxygenase nimmt leicht zu. Er steigt von $0,32 \pm 0,50$ nM/min auf einen Wert von $0,51 \pm 0,61$ nM/min ($p = 0,305$).

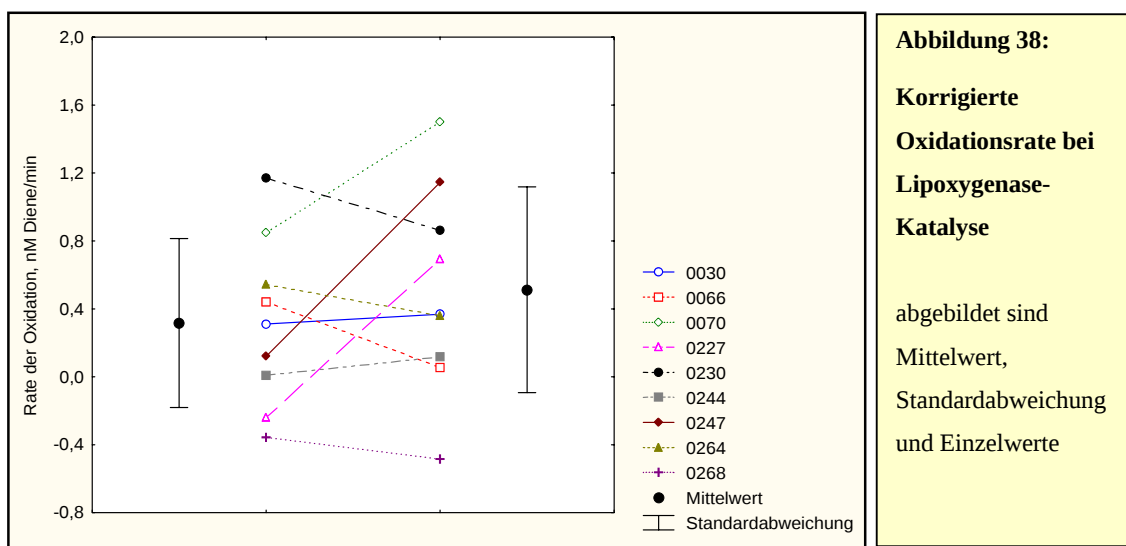


Tabelle 26: Korrigierte Raten der Plasmaoxidation unter AAPH-Katalyse bzw. unter Katalyse durch Lipoxygenase (nM Diene/min)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
Oxi-Rate_AAPH_	4,27 $\pm$ 3,37	6,16 $\pm$ 3,59	9	0,115
Oxi-Rate_LIPO_	0,32 $\pm$ 0,59	0,51 $\pm$ 0,61	9	0,305
Oxi-Rate_AUTO	1,90 $\pm$ 1,69	1,52 $\pm$ 1,56	9	0,006

Der direkte Vergleich der Autooxidationsdaten (Oxi-Rate-prä_AUTO vs. Oxi-Rate-post_AUTO) zeigt eine statistisch signifikante Abnahme der Plasma-Oxidationsrate. Der Mittelwert verringert sich um 58,3% von 1,90 $\pm$ 1,69 nM Diene/min auf 1,52 $\pm$ 1,56 nM Diene/min. Das entspricht einem p-Wert von p = 0,006.

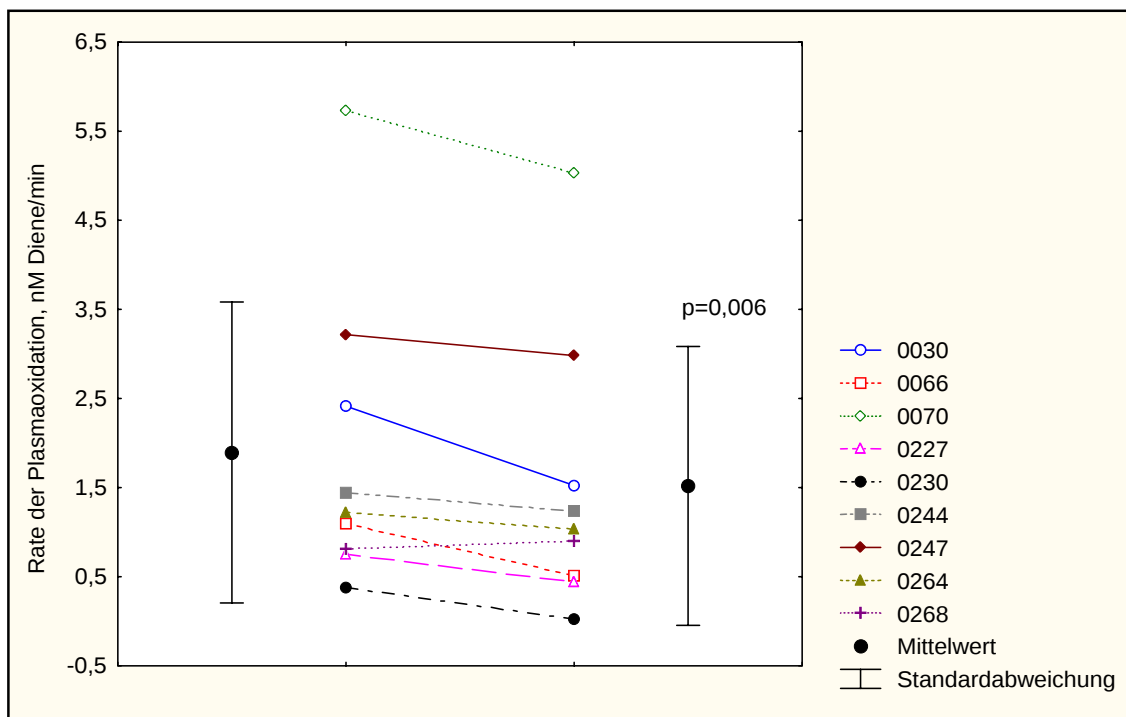
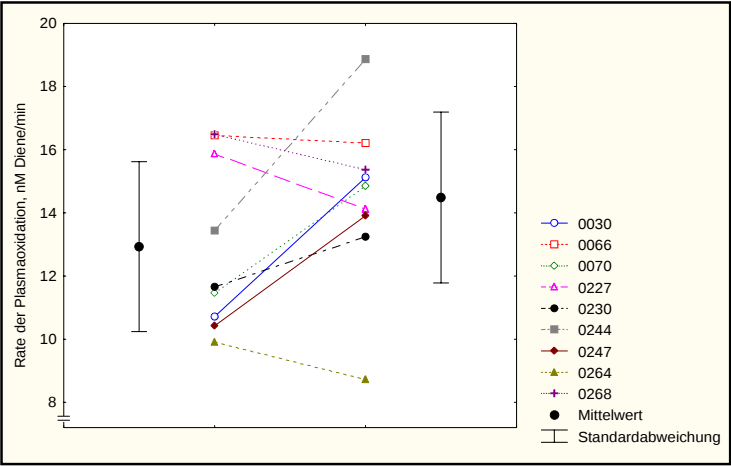


Abbildung 39: Rate der Autooxidation (nM Diene/min); abgebildet sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Einzelwerte.

Vergleicht man zusätzlich die unkorrigierten „Rohdaten“ der Plasma-Oxidationen, so erhält man weitere interessante Meßergebnisse..



Der Mittelwert der AAPH-in-
duzierten Oxidationsrate zeigt
eine Zunahme von $12,93 \pm 2,69$
auf $14,49 \pm 2,71$ nM Diene/min
($p = 0,124$).

Abbildung 40:
Unkorrigierte Oxidationsrate bei
AAPH-Katalyse (nM Diene/min)

Der Mittelwert der Lipoxyge-
nase-katalysierten Oxidations-
rate verringert sich von $2,37 \pm$
 $2,30$ auf $1,93 \pm 1,88$ nM Die-
ne/min ($p = 0,130$).

Abbildung 41:
Unkorrigierte Oxidationsrate bei
Katalyse durch Lipoxygenase
(nM Diene/min)

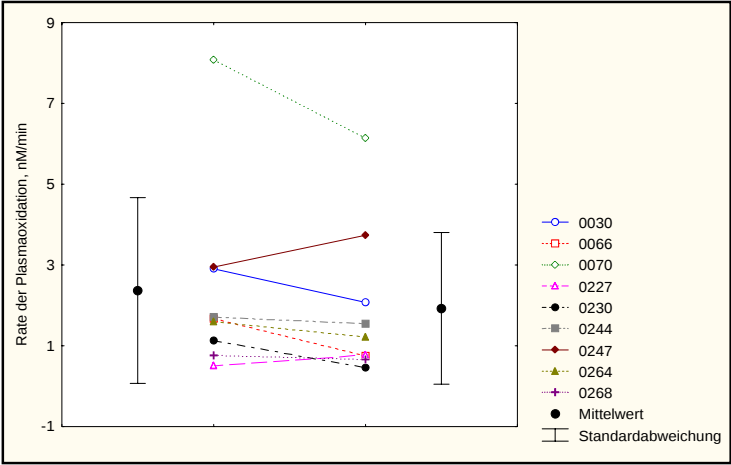


Tabelle 27: Unkorrigierte Raten der Plasmaoxidation (nM Diene/min)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw.	Mittelwert $\pm$ Stdabw.	N	p
	vor Supplementierung	nach Supplementierung		
Oxi-Rate_AAPH	$12,9 \pm 2,7$	$14,5 \pm 2,7$	9	0,124
Oxi-Rate_LIPO	$2,37 \pm 2,30$	$1,93 \pm 1,88$	9	0,130

3.2.5 Oxidationskinetik im Liquor

Der Darstellung der Oxidationskinetik sei, betreffend der Oxidationskurven im Liquor, einschränkend folgende Bemerkung vorangestellt,.

Die Auswertung der Oxidationskurven im Liquor führte zu teilweise statistisch signifikanten Veränderungen der Mittelwerte, die für die verschiedenen Parameter eine Einheitlichkeit der Befunde suggerieren, die durch das sorgfältige Studium der Einzelkurven nicht bestätigt werden konnte. Insofern sei den folgenden Ausführungen der Vorbehalt beigefügt, daß sie sich „lediglich“ an den rohen Zahlenwerten der statistischen Analyse orientieren. Eine Diskussion auf der Grundlage dieser Ergebnisse muß angesichts der z.T. beträchtlichen Variabilität der Oxidationskurven jedoch zumindest kritisch hinterfragt werden.

Oxidation unter EDTA

Für jede Liquorprobe wurden zwei Oxidationsdurchläufe mit EDTA durchgeführt. Sowohl bei AAPH-Katalyse als auch bei Autooxidation wurde die Oxidation durch EDTA komplett inhibiert.

Im folgenden seien beispielhaft zwei Oxidationskurven abgebildet, jeweils ein Doppelgraph (vor (1) und nach (2) Supplementation) unter AAPH-Katalyse und unter Autooxidation. Leider waren die Verläufe nicht immer so regelhaft wie hier.

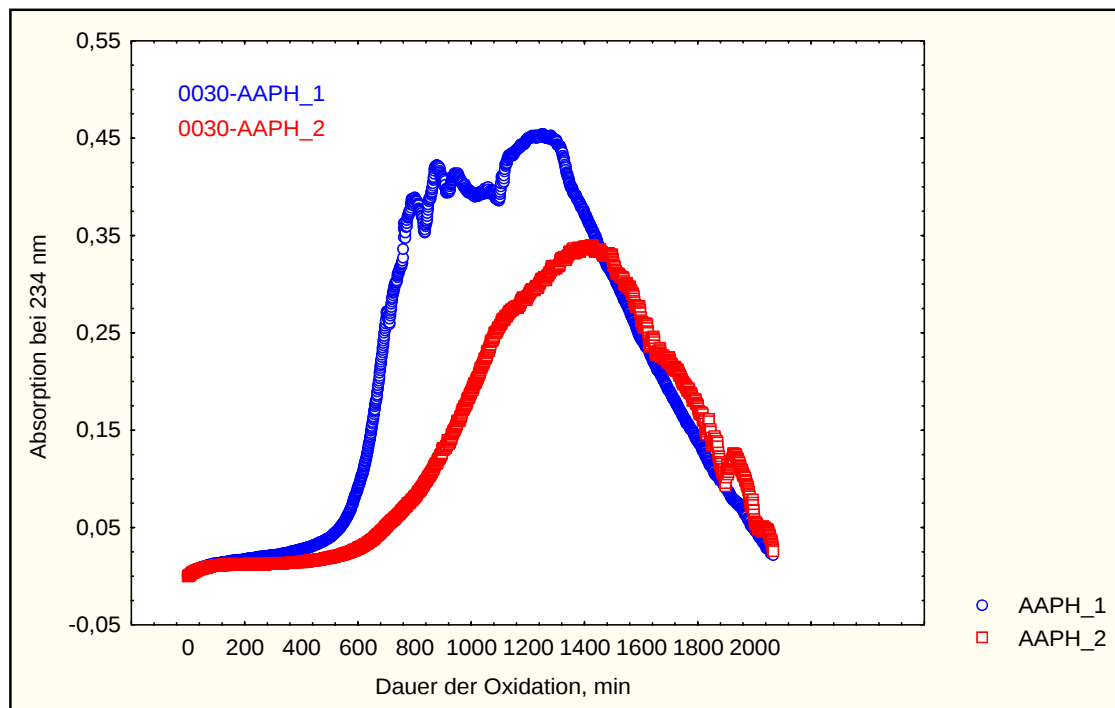


Abbildung 42: Oxidationskurve zweier Liquor-Proben (vor (1) und nach (2) Supplementation) unter AAPH-Katalyse

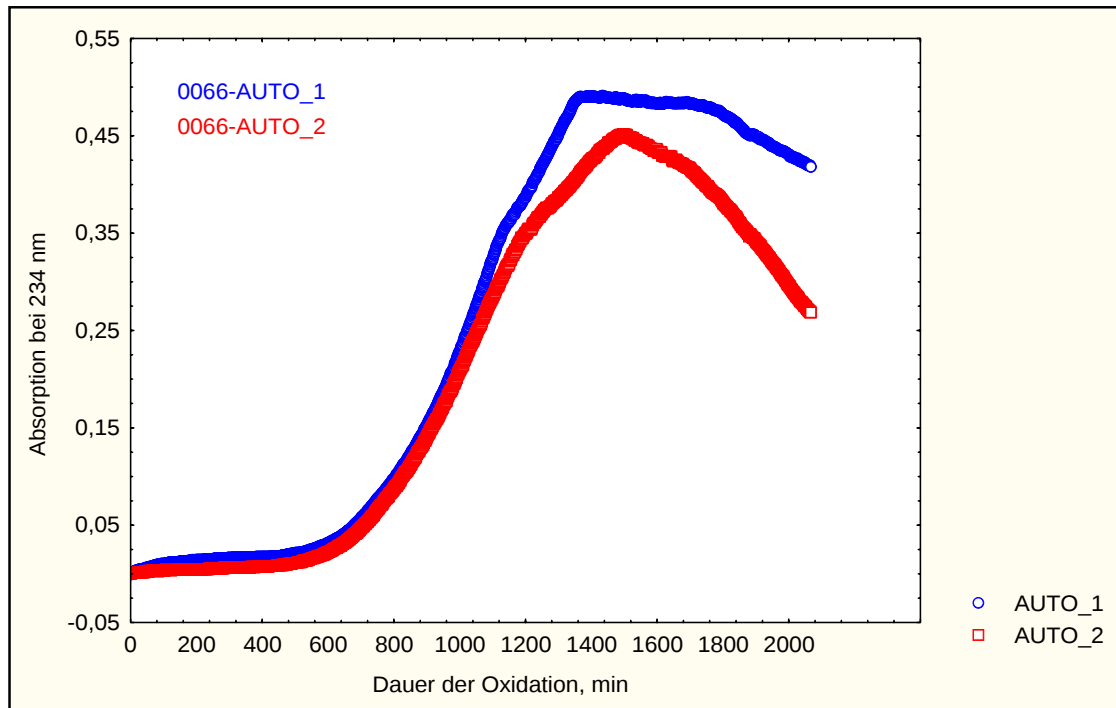


Abbildung 43: Oxidationskurve zweier Liquor-Proben (vor (1) und nach (2) Supplementation) unter AUTO-Katalyse

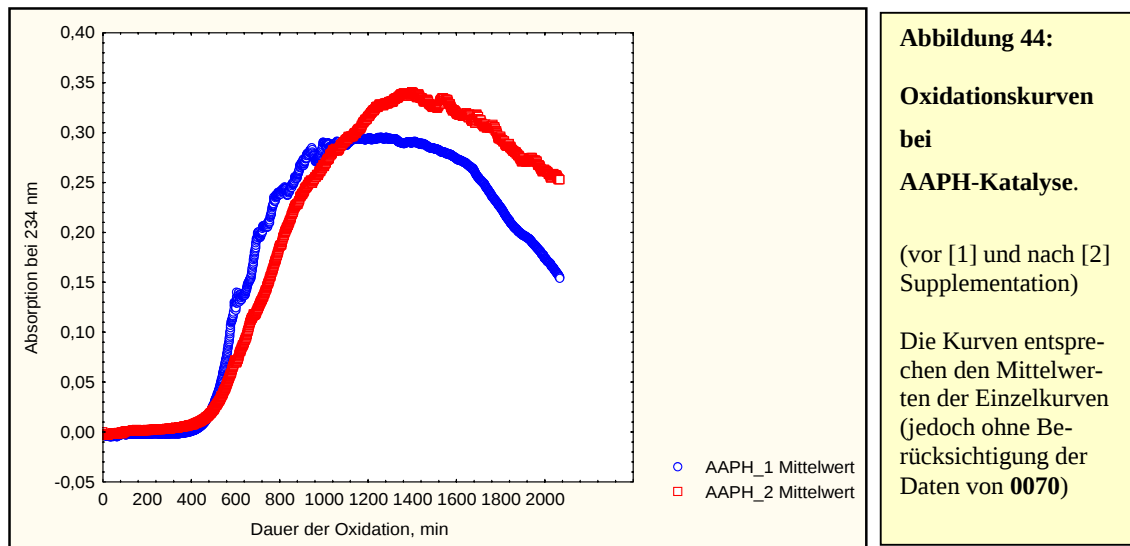
Oxidationskinetik unter AAPH-Katalyse

Vergleicht man die Oxidationsraten der lag-phase vor und nach der Supplementation, so ist ein Anstieg des Mittelwerts zu beobachten. Der Mittelwert erhöht sich von $0,34 \pm 0,94$ nM/min auf $0,71 \pm 1,12$ nM/min ($p = 0,522$).

Der Vergleich der Oxidationsraten der propagation-phase zeigt dagegen eine Abnahme. Der Mittelwert verringert sich von $49,59 \pm 36,90$ nM/min auf $33,72 \pm 18,98$ nM/min ($p = 0,116$).

Tabelle 28: Oxidationsraten im Liquor unter AAPH-Katalyse (nM/min)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementation	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementation	N	p
Oxi-Rate lag-phase	$0,34 \pm 0,94$	$0,71 \pm 1,12$	9	0,522
Oxi-Rate propagation-phase	$49,49 \pm 36,90$	$33,72 \pm 18,98$	9	0,116



Der Vergleich der zeitlichen Dauer der einzelnen Phasen der Oxidation führt zu folgenden Ergebnissen:

Der Mittelwert der **lag-phase** – Dauer steigt von $552,05 \pm 81,37$ min auf $573,78 \pm 110,12$ min ($p = 0,54$) an. Einen statistisch signifikanten Anstieg zeigt die **propagation-phase** – Dauer. Der Mittelwert erhöht sich von anfangs $285,37 \pm 146,99$ auf schließlich $470,14 \pm 257,77$ min. Dies entspricht einem p-Wert von 0,005.

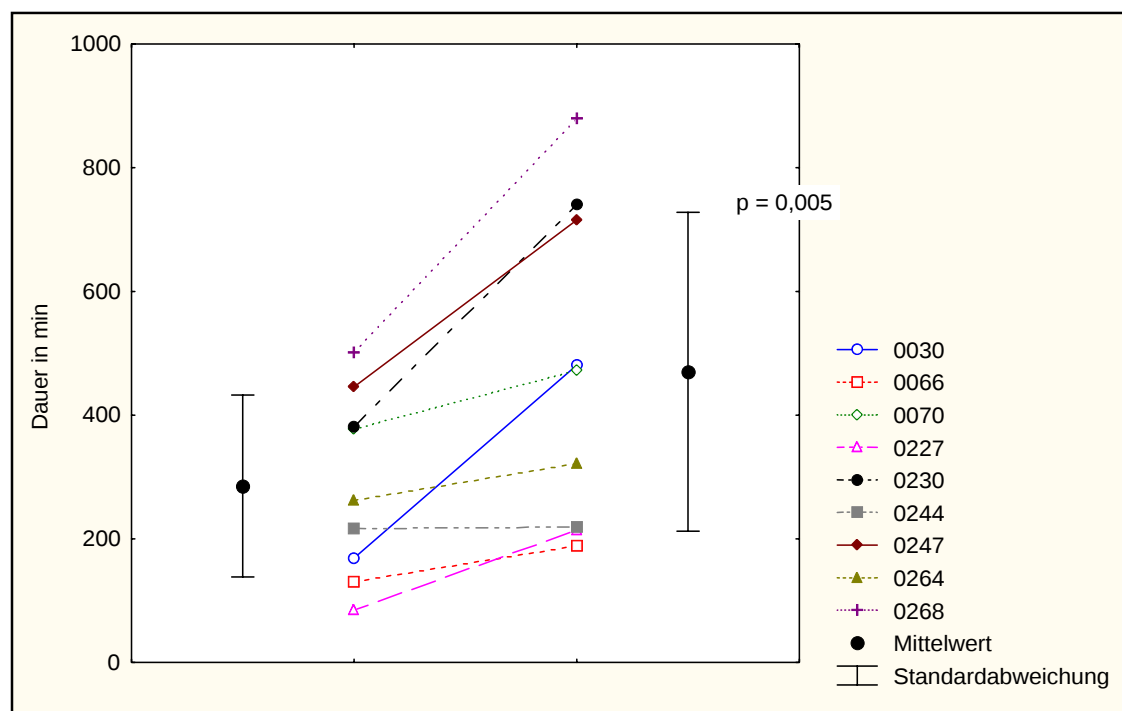


Abbildung 45: Dauer der propagation-phase im Liquor unter AAPH-Katalyse (min)

Tabelle 29: Zeitlicher Verlauf der Oxidationskurven im Liquor unter AAPH-Katalyse (min)

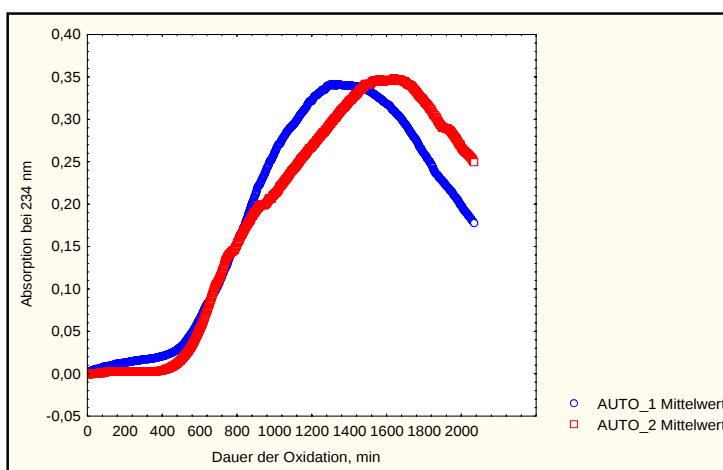
Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
lag-phase	552,05 $\pm$ 81,37	573,78 $\pm$ 110,12	9	0,54
propagation-phase	285,37 $\pm$ 146,99	470,14 $\pm$ 257,77	9	0,005

Oxidationskinetik unter Autooxidation

Betrachtet man die Oxidationsraten der einzelnen Phasen bei Autooxidation, so zeigt sich folgendes Bild. Die Oxidationsraten der **lag-phase** zeigen statistisch signifikante Veränderungen. Der Mittelwert sinkt von $0,91 \pm 0,83$ nM/min auf einen Wert von $0,23 \pm 0,49$ nM/min ab. Dies entspricht einem p-Wert von $p = 0,038$.

Abbildung 46: Oxidationskurven unter Autooxidation;

die Kurven entsprechen den Mittelwerten der Einzelkurven (ohne Berücksichtigung der Daten von 0070)



Die Oxidationsraten der propagation-phase zeigen eine gegenläufige Entwicklung. Der Mittelwert steigt von $20,96 \pm 11,28$ nM/min auf einen Wert von $25,38 \pm 15,71$ nM/min ($p = 0,247$).

Tabelle 30: Oxidationsraten im Liquor bei Autooxidation (nM/min)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
Oxi-Rate lag-phase	0,91 $\pm$ 0,83	0,23 $\pm$ 0,49	9	0,038
Oxi-Rate propagation-phase	20,96 $\pm$ 11,28	25,38 $\pm$ 15,71	9	0,247

Die Dauer der lag- und propagation-phase zeigen folgende Veränderungen: Beide Phasen nehmen an Dauer ab. Während der Mittelwert der lag-phase sich von $623,2 \pm 173,7$ auf $594,3 \pm 176,7$ min erniedrigt ($p = 0,36$), nimmt der Mittelwert für die Dauer der propagation-phase minimal um 1% von $511,9 \pm 108,6$ min auf einen Wert von $506,8 \pm 216,2$ min ($p = 0,95$) ab.

Abbildung 47: Dauer der lag-phase im Liquor unter Autooxidation (min)

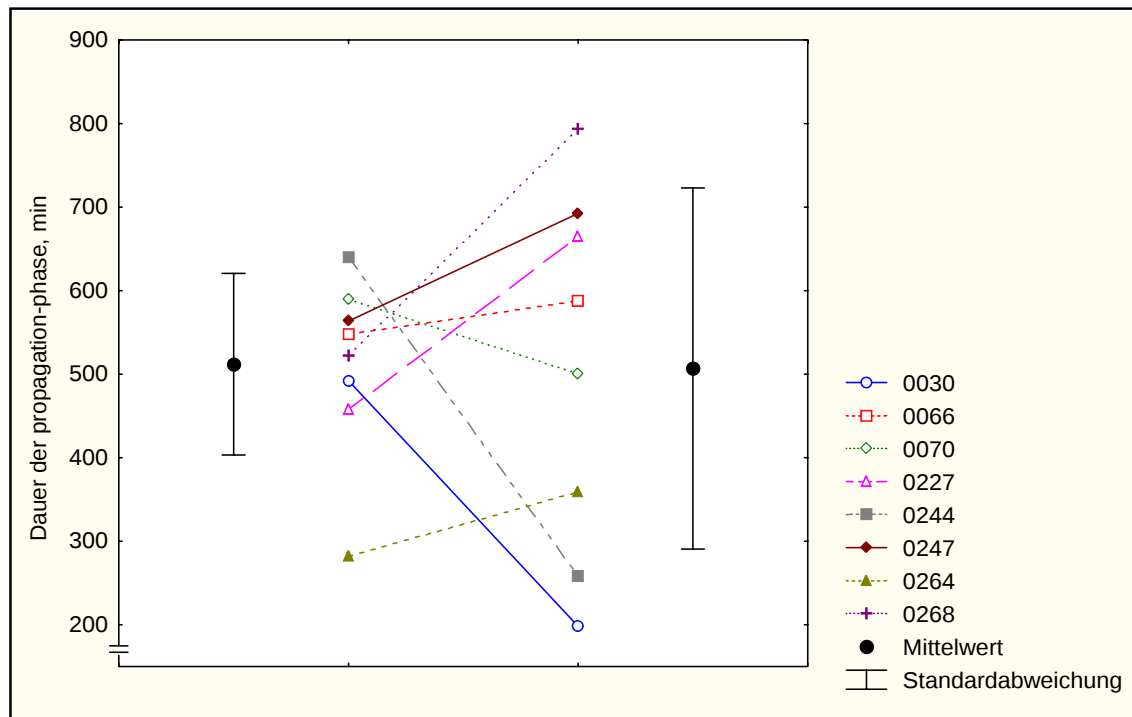
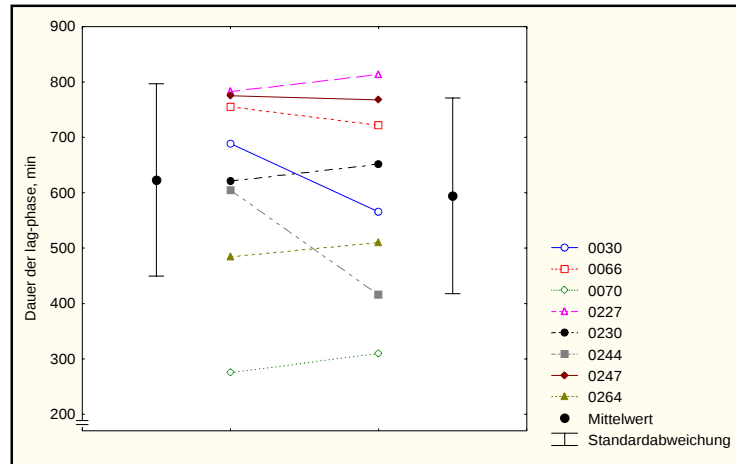


Abbildung 48: Dauer der propagation-phase im Liquor unter Autooxidation (min)

Tabelle 31: zeitlicher Verlauf der Oxidationskurven im Liquor bei Autooxidation (min)

Variable	Mittelwert $\pm$ Stdabw. vor Supplementierung	Mittelwert $\pm$ Stdabw. nach Supplementierung	N	p
lag-phase	$623,2 \pm 173,7$	$594,3 \pm 176,7$	8	0,36
propagation-phase	$511,9 \pm 108,6$	$506,8 \pm 216,2$	8	0,95

3.3 Vergleich des Supplementationskollektivs – mit einem gesunden Vergleichskollektiv

Beide Kollektive besitzen eine ähnliche Altersstruktur. Während die Patienten der Supplementationsstudie im Durchschnitt $71,2 \pm 7,5$ Jahre alt sind, beträgt der Mittelwert des Kollektivs der Gesunden $64,4 \pm 8,9$ Jahre.

Da sich die Daten des allgemeinen Lipidstoffwechsels im Verlauf der Supplementation kaum veränderten, sei hier auf die Daten der vorherigen Abschnitte verwiesen.

3.3.1 Plasma

Tabelle 32: Plasma-Daten (μM)

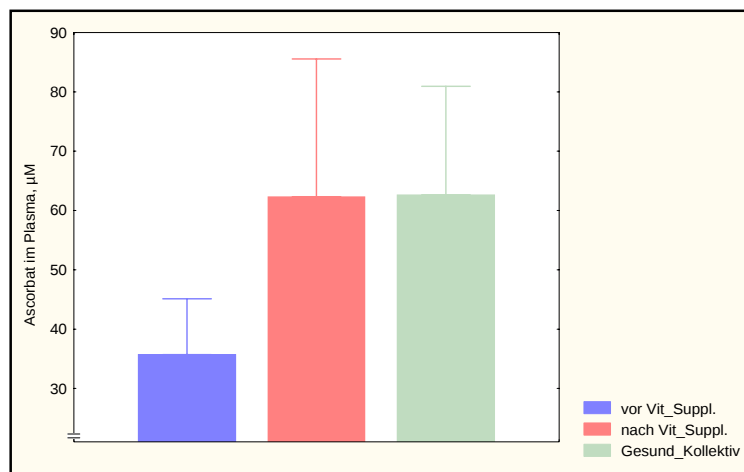
Variable	M-Wert $\pm$ Stdabw. vor Vit-Suppl.	M-Wert $\pm$ Stdabw. nach Vit-Suppl.	N Vit-S	M-Wert $\pm$ Stdabw. gesundes_Kollektiv	N gesund
Ascorbat	$35,70 \pm 9,41$	$62,32 \pm 23,22$	8	$62,64 \pm 18,29$	26
Bilirubin	$11,15 \pm 2,06$	$10,81 \pm 3,34$	9	$13,27 \pm 4,64$	27
Urat	$350,82 \pm 43,20$	$351,79 \pm 50,18$	9	$264,97 \pm 58,79$	27
SH-Gruppen	$450,41 \pm 46,83$	$464,83 \pm 60,98$	9	$460,17 \pm 42,53$	27
α -Tocopherol	$21,78 \pm 7,15$	$31,13 \pm 7,78$	9	$23,17 \pm 4,04$	27
α -Karotin	$0,043 \pm 0,069$	$0,062 \pm 0,117$	9	$0,17 \pm 0,09$	27
β -Karotin	$0,331 \pm 0,417$	$0,373 \pm 0,444$	9	$0,68 \pm 0,37$	27
Ubichinol-10	$0,602 \pm 0,348$	$0,584 \pm 0,398$	9	$0,41 \pm 0,26$	27

M-Wert = Mittelwert; Stdabw. = Standardabweichung; Vit-S(uppl.) = Vitamin-Supplementation

Hydrophile Antioxidantien

Die **Ascorbat**-Konzentration im Plasma nähert sich im Verlauf der Supplementation dem Mittelwert des Kontrollkollektivs an. Während zu Beginn der Studie im Vergleich zum Kollektiv der Gesunden noch eine klar signifikante Differenz bestand ($35,70 \pm 9,41 \mu\text{M}$ vs. $62,64 \pm 18,29 \mu\text{M}$, $p = 0,0009$), sind die Ascorbatkonzentrationen nach der Supplementation nahezu identisch ($62,32 \pm 23,22 \mu\text{M}$ vs. $62,64 \pm 18,29 \mu\text{M}$, $p = 0,971$).

Abbildung 49: Ascorbat-Konzentrationen im Plasma



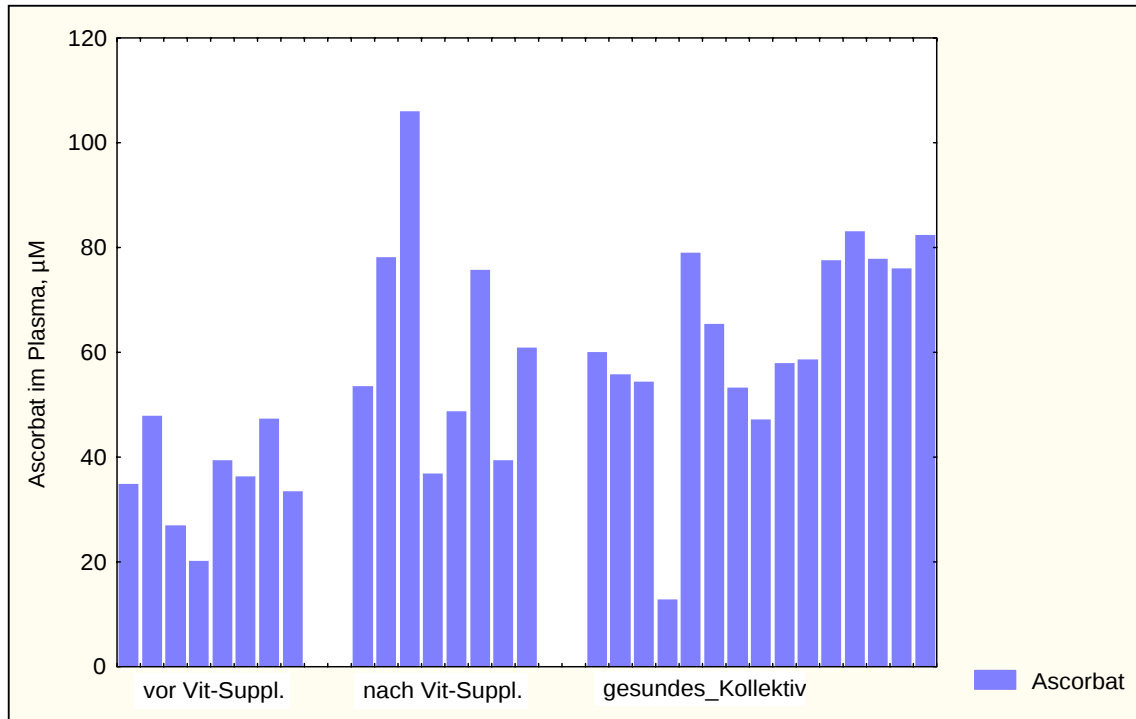


Abbildung 50: Ascorbat im Plasma; vor und nach Vitamin-Supplementation sowie im Kollektiv der Gesunden

Die übrigen hydrophilen Antioxidantien zeigen keine derart deutlichen Veränderungen. Die **Bilirubin**-Konzentration liegt sowohl vor als auch nach der Supplementation im Bereich des Mittelwertes des Kontrollkollektivs (vorher: $11,15 \pm 2,06 \mu\text{M}$; nachher: $10,81 \pm 3,34 \mu\text{M}$; Kontrollen: $13,27 \pm 4,64 \mu\text{M}$). Die **Urat**-Spiegel im Plasma verändern sich im Verlauf der Studie minimal und liegen deutlich über denen der gesunden Personen: $350,82 \pm 43,2 \mu\text{M}$ (vorher) bzw. $351,79 \pm 50,18 \mu\text{M}$ (nachher) vs. $264,97 \pm 58,79 \mu\text{M}$ ($p = 0,0009$ bzw. $0,0011$). Die **SH-Gruppen**-Konzentrationen im Plasma zeigen wiederum eine Angleichung an die Normalwerte im Verlauf der Supplementation. Während sie vor Vitamin-Einnahme mit $450,41 \pm 46,83 \mu\text{M}$ im Vergleich zu $460,17 \pm 42,53 \mu\text{M}$ unter den Werten der Gesunden liegen ($p = 0,600$), sind sie nach der Supplementation mit $464,83 \pm 60,98$

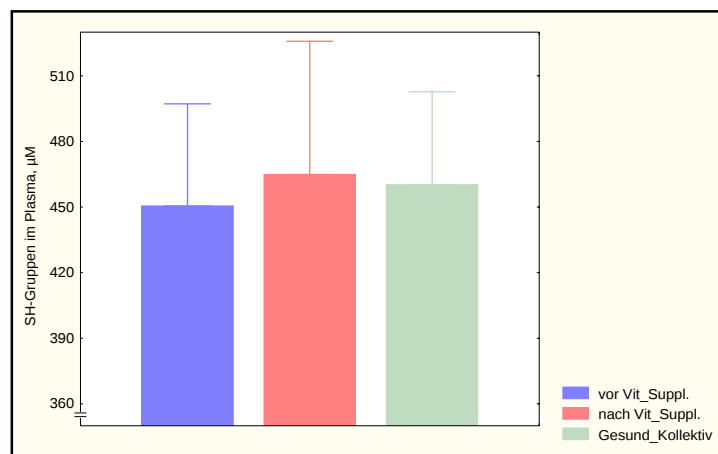
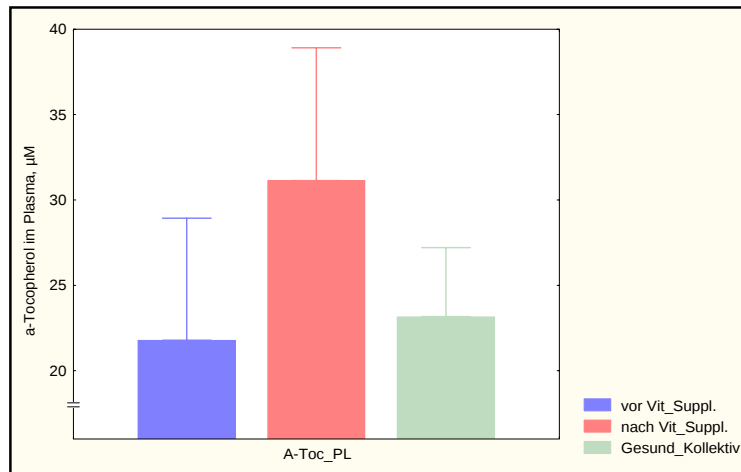


Abbildung 51: SH-Gruppen im Plasma

μM gegenüber den Normalen sogar etwas erhöht ($p = 0,824$). Insgesamt sind diese Veränderungen jedoch relativ gering.

Lipophile Antioxidantien

Die Konzentrationen von **α -Tocopherol** vor der Supplementation liegen mit einem Mittelwert von $21,78 \pm 7,15 \mu\text{M}$ im selben Bereich wie die der Gesunden mit $23,17 \pm 4,04 \mu\text{M}$ ($p =$



$0,538$). Nach Abschluß der Supplementation sind die α -Tocopherol-Spiegel mit $31,13 \mu\text{M}$ $7,78 \mu\text{M}$ gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht ($p = 0,0025$).

Abbildung 52:

α -Tocopherol im Plasma

Sowohl α - als auch β -Karotine bleiben im Verlauf der Supplementierung gegenüber dem Kollektiv der Gesunden erniedrigt. Der Mittelwert der **α -Karotine** liegt mit $0,043 \pm 0,069 \mu\text{M}$ vor bzw. $0,062 \pm 0,117 \mu\text{M}$ nach der Supplementation deutlich unter dem der Gesunden mit $0,172 \pm 0,090 \mu\text{M}$ ($p = 0,0012$ bzw. $0,0166$). Die Konzentration der **β -Karotine** ist mit Mittelwerten von $0,33 \pm 0,42 \mu\text{M}$ vor bzw. $0,37 \pm 0,44 \mu\text{M}$ nach der Supplementation ebenfalls niedriger als der Mittelwert der

Gesunden ($0,68 \pm 0,37 \mu\text{M}$). Die **Ubichinol-10** Konzentration ist sowohl vor als auch nach der Supplementation ($0,60 \pm 0,35 \mu\text{M}$ bzw. $0,58 \pm 0,40 \mu\text{M}$) gegenüber dem gesunden Vergleichskollektiv erhöht.

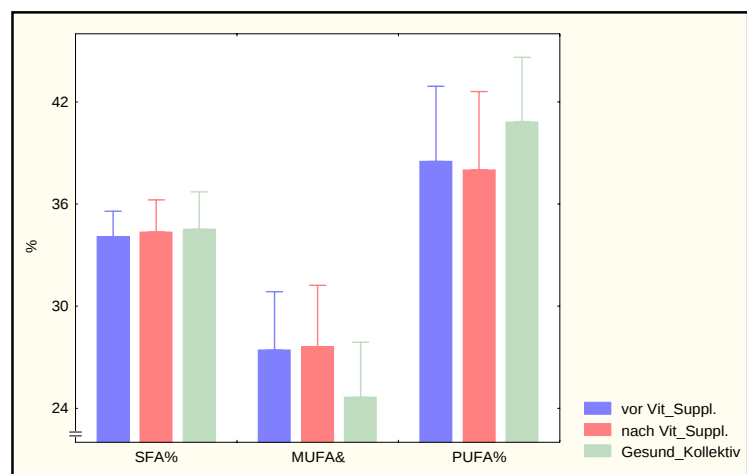


Abbildung 53: Prozentuale Anteile der Fettsäuren im Plasma

Fettsäure-Muster

Wie schon beschrieben, führt die Supplementation nicht zu signifikanten Veränderungen in der Fettsäure-Zusammensetzung. Daher bleiben die Differenzen vor und nach der Supplementation im Vergleich zu den Gesunden weitestgehend gleich. Der Anteil der gesättigten Fettsäuren nähert sich im Verlauf der Supplementation etwas dem Normalwert an, dagegen vergrößern sich die Differenzen der einfach und mehrfach gesättigten Fettsäuren sogar noch leicht. Insgesamt sind diese Veränderungen jedoch sehr gering.

Tabelle 33: Fettsäure-Daten im Vergleich (Plasma); Supplementations-Kollektiv vs. Gesunde (%)

Variable	M-Wert $\pm$ Stdabw. vor Vit-Suppl.	M-Wert $\pm$ Stdabw. nach Vit-Suppl.	N Vit-S	M-Wert $\pm$ Stdabw. gesundes_Kollektiv	N gesund
SFA%	34,08 $\pm$ 1,50	34,37 $\pm$ 1,88	9	34,51 $\pm$ 2,21	16
MUFA%	27,42 $\pm$ 3,43	27,62 $\pm$ 3,61	9	24,65 $\pm$ 3,23	16
PUFA%	38,50 $\pm$ 4,42	38,01 $\pm$ 4,60	9	40,84 $\pm$ 3,78	16

M-Wert = Mittelwert; Stdabw. = Standardabweichung; Vit-S(uppl.) = Vitamin-Supplementation

Oxidationskinetik

Der Vergleich der Oxidationsraten im Plasma fügt sich nahtlos ein in die bisherigen Ergebnisse der Oxidationsanalysen. Wie schon beim Vergleich des Gesamt-AD-Kollektivs mit den Normalwerten sind auch die Mittelwerte des Supplementationskollektivs gegenüber dem Kollektiv der Gesunden deutlich erhöht. Interessant ist folgendes Meßergebnis: Während die Oxidationsraten unter Lipoxxygenase und bei Autooxidation im Verlauf der Supplementationsstudie abnehmen (von $2,37 \pm 2,30$ auf $1,93 \pm 1,88$ nM Diene/min unter Lipoxxygenase und von $1,90 \pm 1,69$ auf $1,52 \pm 1,56$ nM Diene/min bei Autooxidation) und sich somit dem Mittelwert des Vergleichskollektivs der Gesunden von $1,18 \pm 2,14$ nM Diene/min für

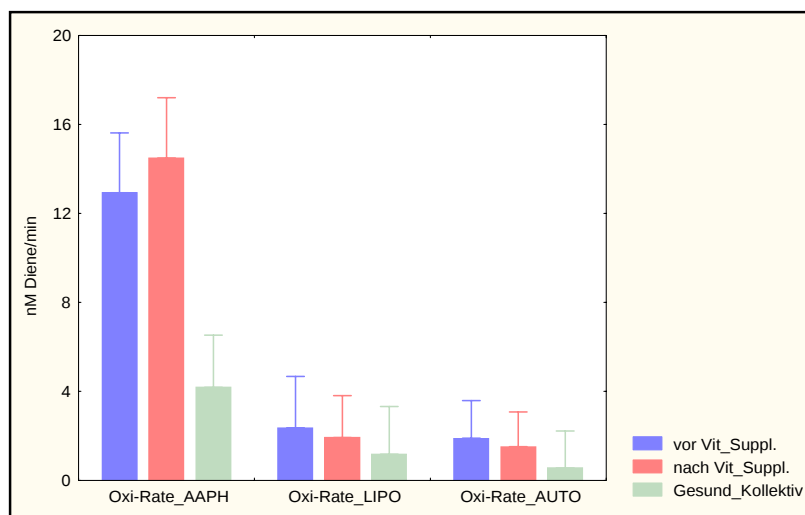


Abbildung 54: Oxidationsraten des Plasma im Vergleich (nM Diene/min)

Lipoxygenase und $0,56 \pm 1,66$ nM Diene/min bei Autooxidation annähern, erhöht sich die Differenz der Oxidationsraten bei AAPH-Katalyse im Verlauf der Studie noch zusätzlich. Die Rate steigt von $12,93 \pm 2,69$ auf $14,49 \pm 2,71$ nM Diene/min und liegt damit deutlich über dem Normalwert von $4,19 \pm 2,35$ nM Diene/min.

3.3.2 Liquor

Ähnlich wie im Plasma nähert sich die **Ascorbat**-Konzentration im Liquor im Verlauf der Supplementation dem Mittelwert des gesunden Vergleichskollektivs an. Während vor der Studie zwischen beiden Kollektiven noch eine sehr deutliche Differenz besteht, die nur knapp die Kriterien statistischer Signifikanz verfehlt ($166,56 \pm 66,96$ μ M vs. $220,48 \pm 49,44$ μ M; $p = 0,060$), ist diese Differenz nach der Supplementierung schon wesentlich kleiner geworden ($194,49 \pm 55,68$ μ M vs. $220,48 \pm 49,44$ μ M; $p = 0,296$).

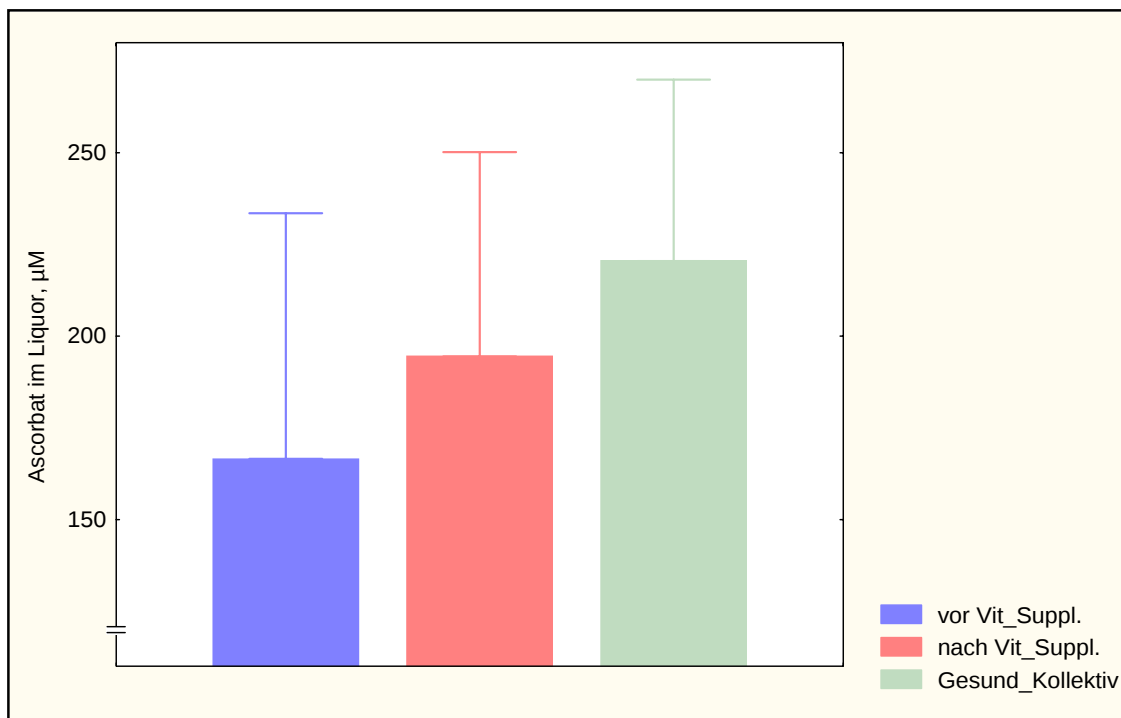


Abbildung 55: Liquor-Konzentration von Ascorbat (μ M)

Auch die **α -Tocopherol**-Spiegel besitzen die gleiche Tendenz, wie sie im Plasma zu beobachten ist. Vor Beginn der Supplementation befindet sich der Mittelwert der α -Tocopherol-Spiegel in einem Bereich von $63,66 \pm 19,14$ nM und somit vergleichsweise nahe dem des Kollektivs der Gesunden mit $59,10 \pm 31,15$ nM ($p = 0,710$). Im Verlauf der Supplementierung

führt der signifikante Anstieg der α -Tocopherol-Konzentration auf einen Mittelwert von $99,13 \pm 44,89$ nM zu einer deutlichen Zunahme der Differenz zum Vergleichskollektiv, die somit statistische Signifikanz erlangt ($p = 0,036$).

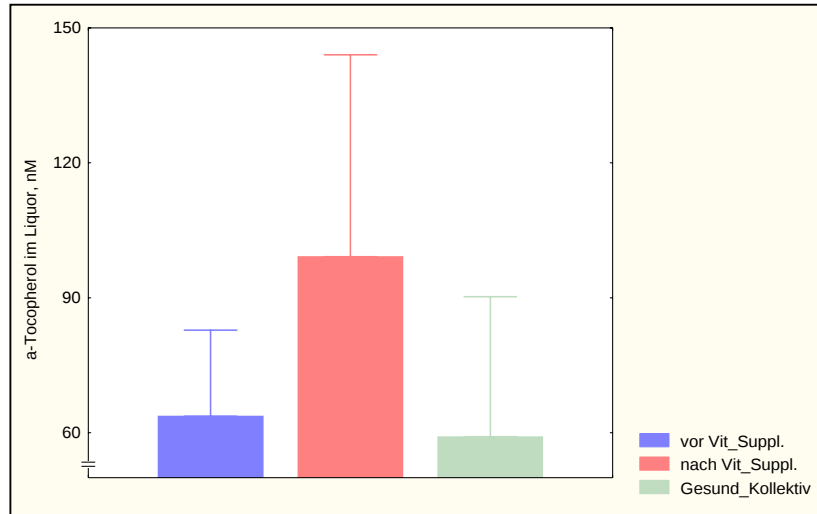


Abbildung 56: α -Tocopherol-Konzentrationen im Liquor

Fettsäuren

Wie schon beim Vergleich des Gesamt-AD-Kollektivs mit dem gesunden Vergleichskollektiv sind auch beim Vergleich mit dem Supplementationskollektiv die Unterschiede in der Fettsäure-Zusammensetzung des Liquors sehr ausgeprägt. Die Werte der Tabelle 34 verdeutlichen, daß die bestehenden Differenzen im Fettsäuremuster des Liquors sich im Verlauf der Supplementation nicht bedeutend verringern. Im Falle der gesättigten (SFA%) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA%) vergrößern sich die Differenzen sogar und erreichen beide statistische Signifikanz (SFA%: $p = 0,028$; PUFA%: $0,169$).

Tabelle 34: Fettsäure-Daten im Vergleich (Liquor); Supplementations-Kollektiv vs. Gesunde (%)

Variable	M-Wert $\pm$ Stdabw.	M-Wert $\pm$ Stdabw.	N	M-Wert $\pm$ Stdabw.	N
	vor Vit-Suppl.	nach Vit-Suppl.		gesundes_Kollektiv	gesund
SFA%	$50,79 \pm 4,87$	$55,94 \pm 10,03$	9	$47,67 \pm 4,07$	10
MUFA%	$38,33 \pm 2,87$	$33,26 \pm 7,97$	9	$36,86 \pm 4,40$	10
PUFA%	$10,88 \pm 3,23$	$10,80 \pm 4,22$	9	$15,47 \pm 3,46$	10

M-Wert = Mittelwert; Stdabw. = Standardabweichung; Vit-S(uppl.) = Vitamin-Supplementation

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die orale Supplementation der Antioxidantien Vitamin E und C bei AD-Patienten zu einer entsprechenden Anhebung der Konzentrationen in Plasma und Liquor führt und wenn ja, ob die erhöhten Wirkkonzentrationen dieser Vitamine einen antioxidativen Effekt auf die Oxidierbarkeit von Liquor und Plasma, d.h. einen protektiven und therapeutischen Nutzen im Rahmen der AD besitzen.

4.1 Bestimmung der Antioxidantien

4.1.1 Hydrophile Antioxidantien

Sowohl im Liquor als auch im Plasma sind die Ascorbat-Konzentrationen der AD-Patienten gegenüber den Normalwerten der Gesunden statistisch signifikant erniedrigt. Im Plasma um **36,5%** und im Liquor um **26,5%**. Diese Beobachtungen decken sich sowohl mit den Beobachtungen von Jeandel et al. (1989) als auch mit neueren Untersuchungen von Schippling et al. (1999). Korrelationsanalysen ergaben jedoch keine nennenswerten Korrelationen zwischen den Ascorbat-Werten der AD-Patienten und klinischen Parametern wie Minimal-Status, Schwere der Erkrankung oder dem Alter der Patienten.

Die Analyse der übrigen hydrophilen Antioxidantien zeigte keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen dem AD- und dem Kontroll-Kollektiv. Nennenswert ist jedoch die Differenz der SH-Gruppen-Konzentration im Plasma. Bei AD-Patienten waren die Werte deutlich um 6% erniedrigt, wenn auch nicht statistisch signifikant.

4.1.2 Lipophile Antioxidantien

Die Differenzen der lipophilen Antioxidantien sind vergleichsweise gering. Lediglich die Konzentration von α -Karotin im Plasma ist bei AD-Patienten gegenüber dem Vergleichskollektiv signifikant um **47,4%** erniedrigt. Die α -Tocopherol-Werte zeigen dagegen keine signifikanten Differenzen. Der Mittelwert des AD-Kollektivs ist sogar gegenüber den Gesunden um 15,7% erhöht. Während diese Befunde im Gegensatz zu früheren Publikationen von Toghi et al. (1994) und Jiménez-Jiménez et al. (1997) stehen, die signifikant erniedrigte α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Liquor von AD-Patienten beschrieben, stehen die Meßergebnisse in Einklang mit Schippling et al. (1999), der keine wesentlichen Differenzen der α -Tocopherol-Konzentrationen in Plasma und Liquor zwischen AD-Kollektiv und gesunden Personen fand.

Die Ergebnisse bestätigen den Zusammenhang von Oxidativem Streß und der AD, indem sie eine offensichtliche Störung der antioxidativen Abwehrmechanismen im Plasma und Liquor der betroffenen Personen belegen.

Toghi et al. (1994) sieht den **klinischen Zustand der Patienten** als mögliche Ursache für Mangel- oder Fehlernährung, die die erniedrigten Werte der nahrungsabhängigen Antioxidantien erklären könnte. Der Allgemeinzustand unserer Patienten war jedoch gut. Eine weitere Möglichkeiten wäre ein **gestörter Transportmechanismus** der betroffenen Antioxidantien. Da im Falle von Ascorbat nicht nur die Liquor-, sondern auch die Plasma-Konzentration signifikant erniedrigt ist, muß diese Möglichkeit als sehr gering gelten.

Eine anderer zugrundeliegender Mechanismus könnte **der vermehrte Verbrauch der Antioxidantien** im Rahmen der AD sein, bedingt durch gesteigerten oxidativen Streß, der nur unzureichend oder gar nicht durch eine vermehrte Aufnahme ins ZNS kompensiert wird.

Die Tatsache, daß aus der Reihe der Antioxidantien vor allem Ascorbat erniedrigt ist, kann mithilfe der Oxidationsmessungen von Arlt et al. (1999) erklärt werden, nach denen Ascorbat das Antioxidans ist, das während der Oxidation als erstes verbraucht wird; ein weiterer Hinweis auf die herausragende Bedeutung von Ascorbat als Antioxidans des Liquors. Die weitgehend normalen α -Tocopherol-Werte stimmen mit den Ergebnissen experimenteller Oxidationsstudien des Liquors überein, nach denen α -Tocopherol in seiner Konzentration erst abnimmt, wenn Ascorbat weitgehend verbraucht ist (Frei et al. 1989; Karten et al. 1997; Arlt et al. 1999). Als präventives Antioxidans der wäßrigen Phase vermag Ascorbat praktisch alle Peroxyl Radikale einzufangen, noch bevor diese Plasma- bzw Membran-Lipide attackieren können. (Frei et al. 1989). Für die Erklärung der signifikant erniedrigten Plasma-Konzentrationen von α -Karotin können die Ausführungen von Kontush et al. (2000) angeführt werden. Kontush et al. (2000) beschreiben α - und β -Karotin als bedeutende Radikalfänger im Falle von NO-induzierter Oxidation. Bei Oxidationsstudien zeigten die Konzentrationen dieser Substanzen bei NO-induzierter Oxidation einen gegenüber α - und γ -Tocopherol deutlich beschleunigten Verbrauch. Karotine scheinen freie Radikale schon abfangen zu können, noch bevor diese mit α -Tocopherol reagieren können. Anders als α -Tocopherol agieren sie wahrscheinlich nicht als Kettenabbruch-Antioxidantien, sondern gehören wie Ascorbat zu den präventiven Antioxidantien.

4.1.3 Ergebnis der Supplementation

Die in vivo Supplementation mit Ascorbat und Tocopherol führte in Plasma und Liquor zum gewünschten Anstieg der Konzentrationen. Sowohl Ascorbat als auch α -Tocopherol zeigen klare, statistisch signifikante Anstiege ihrer Werte. Die Konzentration von Ascorbat erhöht sich im Plasma um **74,7%**, im Liquor um **16,8%**. Neben den supplementierten Antioxidantien waren noch Anstiege der SH-Gruppen im Plasma (um **3,2%**) sowie Zunahmen der Karotine zu beobachten (α -Karotin steigen um **13,3%**, β -Karotin um **26,9%**).

Ascorbat nähert sich im Laufe der Supplementation den Normalwerten der Gesunden an, im Plasma entsprechen die Konzentrationen nach der Supplementation sogar denen der Gesunden. Die Ascorbat-Werte in Liquor und Plasma korrelieren statistisch signifikant ($r = 0,84$, $p = 0,10$) zum Zeitpunkt nach der Supplementation. Auch α -Tocopherol zeigt klare Anstiege der Werte in Plasma (**42,9%**) und Liquor (**55,73%**), die somit nach der Supplementation deutlich über den Werten des gesunden Vergleichskollektivs liegen.

Schon Lönnrot et al. (1995) beschrieben einen klaren supplementationsbedingten Anstieg von Ascorbat im Laufe einer vier-wöchigen oralen Supplementation. Da Ascorbat aufgrund seines hydrophilen Charakters die Blut-Hirn-Schranke nicht direkt überwinden kann, diskutiert man die Existenz eines spezifischen aktiven Transportsystems für Ascorbat, deren Lokalisation im Plexus choroideus vermutet wird (zitiert nach Lönnrot et al. 1995). Dieser Mechanismus könnte eventuell auch die gegenüber dem Plasma erhöhte Ascorbat-Konzentration im Liquor erklären.

Die positiven Resultate der α -Tocopherol-Supplementation in Plasma und Liquor widerlegen die Zweifel über die Ineffektivität der Supplementation für die Anhebung der α -Tocopherol-Werte im Liquor. Zwar wiesen schon Toghi et al. (1994) darauf hin, daß in neurologisch unauffälligen Personen die orale Gabe von α -Tocopherol zu deutlichen Erhöhungen der Liquor-Werte führen, jedoch zeigte die Suppletionsstudie von Pappert et al. (1996), die Parkinson-Patienten über fünf Monate mit steigenden Dosen α -Tocopherol supplementierte, keinen dosisabhängigen, signifikanten Anstieg im ventrikulären Liquor, während im gleichen Zeitraum die Plasmakonzentrationen von α -Tocopherol signifikant um über 600% stiegen. Vatassery et al. (1991) untersuchten die α -Tocopherol –Spiegel in Liquor- und Serumproben von 40 gesunden männlichen Testpersonen und fanden keine signifikante Korrelation zwischen den α - und γ -Tocopherol-Werten im Serum einerseits und im Liquor andererseits.

Unklar bleibt weiterhin der **Transportmechanismus von α -Tocopherol ins ZNS**. Theoretisch könnte α -Tocopherol aufgrund seines lipophilen Charakters die Blut-Hirnschranke direkt überwinden. In Wirklichkeit ist dies jedoch offensichtlich nicht der Fall. So zeigen die Studien von Adams et al. (1994) bei Mäusen einen überraschend geringen „brain uptake index“ von α -Tocopherol.

Interessanterweise beobachtete Vatassery et al. (1991) eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der α -Tocopherol-Konzentration im Liquor und der totalen Protein- sowie der Albumin-Konzentration. Im Plasma wird α -Tocopherol von Lipoproteinen transportiert. Lipide, Lipoproteine und α -Tocopherol sind im Liquor in nur sehr geringer Konzentration zu finden (Vatassery et al. 1991; zitiert nach Pappert et al. 1996). Vatassery et al. (1991) vermutet daher den Eintritt α -Tocopherols in den Liquor als Tocopherol-Protein-Komplex, Toghi et al. (1994) zitiert Studien nach denen α -Tocopherol wahrscheinlich von LDL-Partikel im Plasma transportiert und über spezifische endotheliale Rezeptoren ins ZNS transportiert wird.

Der Anstieg der α -Tocopherol-Werte im Liquor im Verlauf der Supplementation geht mit einer leichten Erhöhung der TFA im Liquor einher sowie mit einer statistisch signifikanten Zunahme der Konzentration des ebenfalls von Lipoproteinen transportierten Cholesterins im Liquor um 24 %.. Während die Liquor-Konzentrationen von α -Tocopherol und Cholesterin nach der Supplementation nicht signifikant miteinander korrelieren ($r = 0,372$, $p = 0,324$), ist die Korrelation im Liquor zwischen TFA- und α -Tocopherol nach der Supplementation signifikant (vorher: $r = 0,624$, $p = 0,072$; nachher: **$r = 0,835$, $p = 0,005$**). Gestützt wird das Bild beim Betrachten der Korrelation im Gesamt-AD-Kollektiv. Sowohl Cholesterin und α -Tocopherol als auch TFA und α -Tocopherol korrelieren im Liquor statistisch signifikant miteinander (Cholesterin_Li / α -Tocopherol_Li: $r = 0,675$, $p < 0,001$; TFA_Li / α -Tocopherol_Li: $r = 0,552$, $p = 0,003$). Dies könnten Hinweise auf den vermuteten Transportmechanismus von α -Tocopherol als α -Tocopherol-Lipoprotein-Komplex (Vatassery et al. 1991) sein, jedoch können sie den statistisch signifikanten Anstieg des α -Tocopherol nicht ausreichend erklären.

4.2 Oxidations-Parameter

4.2.1 Fettsäuremuster in Plasma und Liquor

Entsprechend gleichlautenden Ergebnissen in der Literatur (Markesbery et al. 1997) ist der Anteil der PUFA in Plasma und Liquor der untersuchten AD-Patienten gegenüber den Werten der Gesunden deutlich erniedrigt. Im Plasma um **5,7%**, im Liquor sogar statistisch signifikant um **22,8%**. Während sich die Anteile der SFA im Plasma kaum unterscheiden (Differenz 1,3%), ist der SFA-Gehalt im Liquor der AD-Patienten gegenüber den Gesunden statistisch signifikant um **12,6%** erhöht. Ähnliche Tendenzen werden bei Toghi et al. (1994) beschrieben. Die Verschiebungen im Fettsäure-Muster, die bei den AD-Patienten zu beobachten sind, fügen sich nahtlos ein in das Konzept von der vermehrten Bildung freier Radikale als pathogenetischem Prinzip der AD. Der stark erniedrigte Gehalt der gegenüber freien Radikalen besonders gefährdeten PUFA im Liquor ist ein anschauliches Indiz für die gesteigerte Lipidperoxidation im ZNS.

Leider führte die Supplementation nicht zu einer Verringerung dieser Veränderungen im Fettsäure-Muster. Die erhoffte Erhöhung des Anteils der PUFA blieb aus. Weder im Plasma noch im Liquor kam es zu einer Zunahme dieser Fettsäure-Fraktion. Im Plasma nahm die totale Konzentration der PUFA im Verlauf der Supplementation sogar signifikant um 7,6 % ab. Die Dauer der Supplementation war offensichtlich zu kurz um das Fettsäuremuster der AD-Patienten zu normalisieren.

4.2.2 Oxidationskinetik

Die Oxidationsanalysen in Liquor und Plasma zeigen einige wegweisende, wenn auch nicht immer statistisch signifikante Veränderungen der Oxidationskinetik in ihrem zeitlichen Verlauf. Im Vergleich mit einem Kontrollkollektiv gesunder Personen zeigt sich, daß die Plasma-Oxidationsraten der AD-Patienten deutlich erhöht sind, und zwar für alle drei Oxidationsbedingungen (bei Lipoxygenase-Katalyse um **51,7%**, bei AAPH-induzierter Oxidation um über **300%** und unter Autooxidation um über **150%**). Im Falle der AAPH-induzierten, unkorrigierten Oxidationsrate ergab sich eine klare, statistisch signifikante Differenz. Die Differenzen bei Lipoxygenase-Katalyse und unter Autooxidation fallen zwar geringer aus, zeigten aber die gleiche Tendenz. Diese Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen der Oxidationsmessungen von Schippling et al. (1999). Beim Vergleich der Oxidationskinetik in Liquor und Plasma von jeweils 29 AD-Patienten und nicht-dementen, gesunden Vergleichspersonen ergab sich ein statistisch hoch signifikanter Anstieg der Oxidationsraten im Plasma beim AD-Kollektiv, unabhängig von den jeweiligen Oxidationsbedingungen (Lipoxygenase, AAPH, Autooxidi-

on). Diese Differenzen zeugen von der bei der AD vermehrten Generierung freier Radikale und somit auch gesteigerten Lipidperoxidation. Zudem haben sie sicherlich auch eine Erklärung in der geschwächten antioxidativen Abwehr, abzulesen unter anderem an den signifikant erniedrigten Ascorbat Spiegeln.

4.2.3 Oxidationskinetik im Verlauf der Supplementation

Für das Patienten-Kollektiv der Suppletionsstudie wurden neben den Plasmaoxidationsraten auch die Oxidationskinetik im Liquor vor und nach der Supplementierung mit Vitamin C und Vitamin E bestimmt.

Dabei zeigte sich im Plasma aufgrund der kurzen Zeit und der geringen Anzahl an Patienten ein uneinheitliches Bild. Unter Autooxidation ergibt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Oxidationsrate im Verlauf der Supplementation um **20%**. Auch die Lipoxygenase-induzierten Oxidationsraten nehmen um **18,6%** ab. Diese Entwicklung stimmt überein mit Analysen der Oxidationskinetik im Plasma nach in vitro Supplementationen von Antioxidantien bei Karten et al. (1997). Gegensätzlich sind dagegen die Entwicklungen für AAPH-induzierte Oxidationen, bei denen Zunahmen der Oxidationsraten um **12,1%** auftreten.

Im Liquor zeigte sich ein im Prinzip ähnliches Bild. Während die Supplementierung der Antioxidantien unter Autooxidation zu einer statistisch signifikanten Verringerung der Oxidationsraten der **lag-phase** um über 70% führte, kam es bei AAPH-Oxidationen durch die Supplementierung zu einer Zunahme der Oxidationsrate der **lag-phase** um über 100%. Allerdings führte die Supplementierung unter Autooxidation nicht zur Verlängerung der Phasen-Dauer. Während die propagation-phase praktisch unverändert bleibt (Abnahme der Dauer um 0,9 %), verringerte sich die Dauer der lag-phase um 4,6 %.

Zusammenfassend ergibt sich also folgendes Bild. Die Supplementierung der als Antioxidantien eingesetzten Vitamine Ascorbat und Tocopherol wirkt sich im Plasma lediglich für die Oxidationsverhältnisse bei Autooxidation bzw. unter Katalyse durch Lipoxygenase überwiegend inhibitorisch, also antioxidativ aus, während sie bei AAPH-Katalyse offensichtlich prooxidative Wirkung entfaltet, abzulesen an den gestiegenen Oxidationsraten.

Bei den Oxidationsmessungen im Liquor gilt für die **lag-phase** entsprechendes. Ebenso wie im Plasma führt die Supplementation bei Autooxidation zur Verringerung der ablaufenden Oxidationsraten, während sie unter AAPH-Katalyse eine offensichtlich prooxidative Wirkung besitzt.

Da für beide der supplementierten Vitamine prooxidative Kapazitäten beschrieben sind (Gutteridge et al. 1994; Kontush et al. 1996; Sevanian et al. 1991; Stocker et al. 1991), wären theoretisch sowohl Ascorbat als auch Tocopherol mögliche Verursacher der gesteigerten Oxidation. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die prooxidativen Veränderungen der Oxidationskinetik in Plasma und Liquor auf α -Tocopherol zurückzuführen sind, da, wie in der Einleitung bereits erwähnt, unter physiologischen Bedingungen die antioxidative Wirkung von Ascorbat durch ein komplexes System von Interaktionen mit anderen Substanzen gesichert ist (die Bindung freier Übergangsmetalle durch Caeruloplasmin und Transferrin, die Interaktion mit Urat, etc.). Das Wechselspiel beider Substanzen bei der Regeneration von α -Tocopherol spielt womöglich eine entscheidende Rolle.

Bereits in der Einleitung wurden Einzelheiten der Regeneration von α -Tocopherol beschrieben. Für das Verständnis der Interpretation der Ergebnisse sind folgende Faktoren entscheidend:

Die **Intensität des oxidativen Streß**. Während starke oxidative Bedingungen eine rasche Regeneration durch das häufige Aufeinandertreffen von gebildeten α -TO'-Molekülen ermöglichen und somit die antioxidativen Fähigkeiten von α -Tocopherol unterstützen, ist dies für milde oxidative Bedingungen nicht der Fall (Stocker 1994). Diese Ansicht deckt sich mit den Oxidationsversuchen von Kontush et al. (1996), die Hinweise auf eine möglicherweise prooxidative Wirkung von supplementiertem α -Tocopherol fanden. Hier führte die in-vitro Supplementation von α -Tocopherol in stark-verdünntem Plasma (1:150) bei milden oxidativen Bedingungen ($0,5 \mu\text{M Cu}^{2+}$, $333 \mu\text{M AAPH}$) zu einer Zunahme der Oxidationsraten.

Die **Konzentration wäßriger Co-Antioxidantien**, allen voran Ascorbat. Diese sind in der Lage, an der Interphasen-Grenze entstandene α -TO'-Moleküle zu recyceln und somit die Radikale aus der Lipid-Phase zu entfernen. Diese Auffassung stimmt mit den Oxidationsmessungen von Arlt et al. (1999) und anderen überein. Arlt et al. (1999) konnte zeigen, daß Ascorbat bei der Oxidation von CSF als erstes verbraucht wird. Solange Ascorbat noch meßbar in der CSF verfügbar war, fand keine erwähnenswerte Akkumulation konjugierter Diene statt, dies entsprach dem Zeitraum der lag-phase. Mit dem Verbrauch des Ascorbat endete auch die

lag-phase und die Oxidationsrate stieg steil an. α -Tocopherol zeigt dagegen keine Veränderungen seiner Konzentration in der lag-phase (Karten et al. 1997). In der Anwesenheit von Ascorbat scheint α -Tocopherol vor oxidativem Verbrauch geschützt zu sein und zusammen mit Ascorbat die Lipidperoxidation in Liquor und Plasma komplett zu verhindern (Arlt et al. 1999). Nachweisbar konnte die in vitro Plasma-Supplementation von Ascorbat den Verbrauch von α -Tocopherol signifikant reduzieren im Vergleich mit nicht-supplementiertem Plasma (Karten et al. 1997). In Abwesenheit von Ascorbat kann α -Tocopherol den Anstieg der Lipidhydroperoxide offensichtlich nicht mehr verhindern, sondern fördert die Oxidation der Lipoproteine nach dem TMP-Modell sogar.

Der **Verdünnungsgrad des CSF**. Dieser scheint nach Auffassung von Arlt et al. (1999) einen Einfluß auf die Oxidierbarkeit zu haben. Während unverdünnter Liquor gegenüber Autooxidation geschützt zu sein scheint, zeigt 10fach verdünnter Liquor eine langsame Akkumulation konjugierter Diene als Ausdruck stattfindender Lipidperoxidation. Ursache für diesen Befund könnte die verdünnungsbedingte Verringerung der Ascorbat-Konzentration und somit die Schwächung des Synergismus zwischen dem wasserlöslichen Ascorbat und dem in den Lipoproteinen lokalisierten α -Tocopherol sein.

4.2.4 Fazit

Plasma

Die Plasma-Proben werden vorbereitend nach Regnström et al. (1993) 150fach verdünnt. Wie beschrieben hat der Verdünnungsgrad einen Einfluß auf die Oxidierbarkeit des Plasma. Die starke Verdünnung könnte die Ascorbat-bedingte Regeneration der entstehenden α -TO'-Moleküle einschränken und somit die Balance zwischen prooxidativer und antioxidativer Wirkung von α -Tocopherol zugunsten der Oxidation verschieben.

Bei reiner **Autooxidation oder Lipoxxygenase-induzierter Oxidation** ist die Intensität des oxidativen Streß relativ gering. Unter diesen Bedingungen könnte die verdünnungs- und krankheitsbedingt-niedrige Konzentration von Ascorbat noch ausreichen, die geringe Menge an entstehenden α -TO'-Moleküle zu recyceln. Daher führt die gemeinsame Supplementation von Ascorbat und α -Tocopherol zu einer Inhibition der Oxidation im Plasma.

Bei **AAPH-induzierter Oxidation** ist die Intensität des oxidativen Streß bereits wesentlich stärker. Die geschwächte Interaktion von Ascorbat und α -Tocopherol reicht unter diesen Bedingungen nicht mehr aus, die antioxidative Wirkung von α -Tocopherol zu gewährleisten.

Die gemeinsame Supplementation von Ascorbat und Tocopherol führen daher zu einer Steigerung der Tocopherol-induzierten-Peroxidation (TMP) (Stocker, 1994) und zu steigenden Oxidationsraten.

Liquor

Die Veränderungen der lag-phase entsprechen bezüglich der Oxidationsraten in der Tendenz denen des Plasma. Jedoch zeigen sich auch Veränderungen unter AAPH-Katalyse, die eher antioxidativ zu interpretieren sind (die Verlängerung der lag- und propagation-phase-Dauer; die Abnahme der Oxidationsrate der propagation-phase). Diese eher antioxidative Wirkung der Supplementation kann durch die wesentlich geringere Verdünnung des Liquors und die ohnehin höhere Konzentration von Ascorbat im Liquor verursacht sein. Zudem ist die Konzentration der Tocopherole im Liquor um mehrere 10er-Potenzen geringer als im Plasma. Unter diesen Umständen könnte die Supplementation von Ascorbat und α -Tocopherol, eingebettet in eine noch relativ intakte Interaktion zwischen den beiden Antioxidantien, eine gemeinsame antioxidative Wirkung entfalten.

Letztlich besitzen diese Überlegungen aber rein hypothetischen Charakter. Zu gering und inkonstant sind die Veränderungen der Oxidationskurven. Auch erhält der unternommene Erklärungsversuch keine Unterstützung durch Korrelationsstudien. Es zeigten sich keine substantiellen Korrelationen zwischen den Konzentrationen von Ascorbat und/oder α -Tocopherol einerseits und dem zeitlichen Verlauf der Oxidationskurven in Plasma und Liquor andererseits.

4.3 Medizinische Bedeutung

Insgesamt erlauben die Ergebnisse der Studie, ein positives Fazit zu ziehen. Zunächst konnte ein Erfolg der Supplementation gezeigt werden, da sowohl die Konzentrationen im Liquor und Plasma von α -Tocopherol und Ascorbat signifikant anstiegen und, im Falle von Ascorbat, den Normalwerten voll angeglichen werden konnten. Diese Ergebnisse beweisen die Effektivität der oralen Supplementationstherapie und das Erreichen der erwünschten Wirkkonzentrationen im eigentlichen Zielorgan, dem ZNS. Sie zeigen auch, daß die verwendeten Dosierungen wahrscheinlich ausreichend sind und keine höheren Dosen von 1200 mg Vitamin E gegeben werden müssen.

Zudem zeigen die Analysen der Oxidationskinetik, daß die Supplementation von Vitamin E und C sowohl im Plasma als auch im Liquor unter den Bedingungen der Autooxidation antioxidativ wirkt. Diese antioxidative Wirkung manifestiert sich in den zum Teil statistisch signifikanten Abnahmen der Oxidationsraten. Die zum Teil prooxidativen Effekte, die unter der Katalyse von AAPH zu beobachten waren, bestätigen zwar die theoretischen Annahmen der möglichen prooxidativen Wirkung von α -Tocopherol nach dem TMP-Modell, unter physiologischen Bedingungen spielt dieses prooxidative Potential jedoch keine Rolle. Zum einen ist die wirkungsvolle Regeneration der α -Tocopherol-Radikale durch die in vivo wesentlich höheren Ascorbat-Konzentration gesichert. Zum anderen ist die Intensität des oxidativen Streß in vivo bedeutend geringer als unter den experimentell herbeigeführten Bedingungen in vitro.

Jedoch zeigen die Ergebnisse auch klare Grenzen einer solchen Pilotstudie, bei der die Studiendauer mit 4 Wochen sehr kurz und die Anzahl der teilnehmenden Patienten sehr gering waren, um tatsächlich durchgehend signifikante Veränderungen in der Oxidationskinetik zu bewirken.

5. Zusammenfassung

In der vorliegende Arbeit wurden die Parameter des Oxidationsstoffwechsels in Liquor und Plasma von an der AD leidenden Patienten sowie deren Beeinflußbarkeit durch die orale Supplementation mit Antioxidantien Vitamin C und E untersucht. Die Patienten erhielten täglich 1000 mg Vitamin C und 400 mg Vitamin E über einen Zeitraum von vier Wochen. Zu den erfaßten oxidativen Parametern gehörten die hydrophilen Antioxidantien Ascorbat, Bilirubin, SH-Gruppen und Urat, die lipophilen Antioxidantien α - und γ -Tocopherol, α - und β -Karotin sowie Ubichinol-10. Zudem wurde die Fettsäure-Zusammensetzung sowie die Oxidierbarkeit in Plasma und Liquor bestimmt. Die Messung der Oxidierbarkeit erfolgte unter verschiedenen oxidativen Bedingungen durch kontinuierliche Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm [Regnström et al., 1993].

Die quantitative Analyse der verschiedenen oxidativen Parameter der AD-Patienten zeigte im Vergleich mit einem Kollektiv gesunder Personen z.T. signifikante Unterschiede. Zu diesen zählten die signifikante Erniedrigung der Ascorbat-Konzentration in Plasma und Liquor sowie der α -Karotine im Plasma. Zudem war eine Verschiebung im Fettsäure-Muster sowie eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber in vitro initiierten Oxidationen zu beobachten. Im Liquor zeigten die AD-Patienten eine signifikante Erniedrigung der mehrfach ungesättigten sowie eine signifikante Erhöhung der gesättigten Fettsäuren. Alle diese Veränderungen stützen die These von der zentralen Rolle des oxidativen Streß bei der AD.

Die Supplementation mit den Antioxidantien Vitamin E und C führte zum signifikanten Ansteigen der Konzentrationen dieser Vitamine im Plasma und Liquor. Im Falle von Ascorbat kam es zur Angleichung der stark erniedrigten Konzentrationen an die Normalwerte des gesunden Vergleichskollektivs. Neben den supplementierten Substanzen erhöhten sich auch die Konzentration verschiedener nicht-supplementierter Antioxidantien. Jedoch erlangten diese Veränderungen nicht das Ausmaß statistischer Signifikanz.

Im Oxidationsverhalten wurden ebenfalls signifikante Veränderungen im Laufe der Supplementation registriert. So kam es im Plasma zur signifikanten Verringerung der Oxidationsraten unter Autooxidation. Die Oxidationsraten unter Katalyse des Oxidans Lipoxxygenase verlangsamten sich ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, während die Raten unter AAPH-Katalyse sich erhöhten. Die Auswirkungen der Supplementierung mit Antioxidantien sind auch in den Absorptionskurven des Liquors zu erkennen. So führte die Supplementation zu einer signifikanten Abnahme der Oxidations-Rate in der lag-Phase bei Autooxidation. Kei-

ne bedeutenden Veränderungen gab es dagegen in der Fettsäure-Zusammensetzung von Plasma und Liquor

Die Ergebnisse der Untersuchung indiziert die Erweiterung solcher Supplementationsstudien auf mehr AD-Patienten bei längerer Zeit, um signifikante Veränderungen der Oxidationskinetik zu erfassen und gegebenenfalls eine Beeinflussung der Fettsäure-Muster durch die Supplementation zu erreichen.

6. Abkürzungen

AAPH	2,2'-Azobis (2-Amidinopropane) Hydrochlorid
A β	Amyloid β -Peptid
AD	Alzheimer Demenz
AGE	Advanced Glycation End Products
Al	Aluminium
APP	Amyloid Precursor Protein
α -TO $\cdot$	α -Tocopherol-Radikal
BSTFA	N,O-Bis-(Trimethylsilyl)Trifluoroacetamid
CSF	Cerebrospinal Flüssigkeit
CT	Computer Tomographie
Cu	Kupfer
DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoylsäure)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
Fe	Eisen
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPO ₃	Meta-Phosphorsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoff-Peroxid
4-HNE	4-Hydroxy-Alkenal
LDL	Low Density Lipoprotein

MFA	Monounsaturated Fatty Acids
NFT	Neurofibrillary Tangles
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	STICKSTOFF-MONOXID
O ₂	Elementarer Sauerstoff
O ₂ [·]	Superoxid Radikal
·OH	Hydroxy Radikale
8OH-dG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PS	Presenilin
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
ROS	Reactive Oxygen Species
R [·]	Freies Radikal
SFA	Saturated Fatty Acids
SOD	Superoxid-Dismutase
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TFA	Total Fatty Acids
TG	Triglyceride
TMP	Tocopherol Mediated Peroxidation
TRAP	Total (peroxyl) Radical-Trapping Antioxidant Parameter
τ-Protein	Tau-Protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Literaturanlage

Abuja P.M. (1999) Ascorbate prevents prooxidant effects of urate in oxidation of human low density lipoprotein. FEBS Letters 446: 305-308

Adams, J.D., Wang, B. (1994) Vitamin E uptake into the brain and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. J Cereb Blood Flow Metab 14: 362-363

Adams, R.D., Victor, M., Ropper, A.H. (1999) Degenerative Erkrankungen des Nervensystems. In: Prinzipien der Neurologie. McGraw-Hill, London Übersetzung der 6. Auflage, Kapitel 39, S. 1071-86

Arlt, S.; Finckh, B.; Beisiegel, U.; Kontush, A. (2000) Time-course of oxidation of lipids in human cerebrospinal fluid in vitro. Free Radic.Res. 32: 103-114.

Becker, B.F. (1993) Towards the physiological function of uric acid. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 14: 615-631

Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R., Schubert, D. (1994) Hydrogen Peroxide Mediates Amyloid β Protein Toxicity. Cell, Vol. 77: 817-827

Biesalski, H.-K. et al. (1995) Stoffwechsel und Wirkung der Nahrungsbestandteile. In: Biesalski, H.-K. (Hrsg) Ernährungsmedizin, Thieme, Stuttgart, New York, S.104-158

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

Butterfield, D.A. (1996) Alzheimer`s Disease: A Disorder of Oxidative Stress. Alzheimer`s Disease Review 1: 68-70

Classen, M.(1993) Laborwerte, Referenzbereiche. In: Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. Innere Medizin. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 1684

Ehmann, W.D., Markesbery, W.R., Alauddin, M., Hossain, T.I.M., Brubaker, E.H. (1986) Brain trace elements in Alzheimer`s disease. Neurotoxicology 7: 197-206

Esterbauer, H., Gebinski, J., Puhl, H., Jürgen, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 341-390

Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free. Radic. Biol. Med.* 11: 81-128

Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M. (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communication*, 6: 67-75

Finckh, B., Kontush, A., Commentz, J., Hübner, C., Burdelski, M., Kohlschütter, A. (1995) Monitoring of Ubiquinol-10, Ubiquinone-10, Carotenoids, and Tocopherols in Neonatal Plasma Microsamples Using High-Performance Liquid Chromatography with Coulometric Electrochemical Detection. *Anal. Biochem.* 232: 210-216

Finckh, B., Kontush, A., Commentz, J., Hübner, C., Burdelski, M., and Kohlschütter, A. (1999) High-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical detection of ubiquinol 10, ubiquinone 10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma. *Methods in Enzymol.* 299: 341-348

Flemming, J., Josji, J.G. (1987) Ferritin: Isolation of aluminium-ferritin complex from brain. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 84: 7866-7870

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissue. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509

Frei, B., England, L., Ames, B.N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6377-6381

Goodman, L. (1953) Alzheimer`s disease: A clinico-pathologic analysis of twenty-three cases with a theory on pathogenesis. *J. Nerv. Ment. Dis.* 117: 97-130

Gutteridge, J. M. C. (1978) Caeruloplasmin: A plasma protein, enzyme, and antioxidant. *Ann Clin. Biochem.* 15 (6): 293-296

Gutteridge, J.M.C. (1983) Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett.* 157: 37-40

Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. (1994) Antioxidants: exilirs of life or media hype? In: Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B (eds) Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease. Oxford University Press, p. 40-61

Gutteridge J.M.C., Smith, A. (1988) Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation Biochem. J. 256: 861-865

Halliwell, B. (1988) Albumin:An important extracellular antioxidant? Biochem. Pharmacol. 37, 569-571.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and conceps. Arch. Biochem. Biophys. 246 (2): 501-514

Halliwell, B. Gutteridge, J.M.C. (eds) (1989) Free radicals in biology and medicine, 2nd edn., Oxford Clarendon Press,

Heirwegh, K.P.M., Fevery, J., Meuwissen, J.A.T.P., De Groote, J. (1974) Recent Advances in the Separation and Analysis of Diazo-Positive Bile Pigments. Methods Biochem. Anal. 22: 205-250

Hunter, M. I. S., Nlemadim, B. C., Davidson, D. L. W. (1985) Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in human plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. Neurochem. Res. 10: 1645-1652

Jeandel, C., Nicolas, M.B., Dubois, F., Nabet-Belleville, Penin, F., Cuny, G. (1989) Lipid Peroxidation and Free Radical Scavengers in Alzheimer`s Disease. Gerontology 35: 275-282

Jiménez-Jiménez, F.J., de Bustos, F., Molina, J.A., Benito-León, J., Tallón-Barranco, A., Gasalla, T., Ortí-Pareja, M., Guillamón, F., Rubio, J.C., Arenas, J., Enríquez-de-Salamanca, R. (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Alzheimer`s disease. J Neural Transm 104: 703-710

Karten, B., Beisiegel, U., Gercken, G., Kontush, A. (1997) Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. Chemistry and Physics of Lipids 88: 83-96

Kleihues, P., Kiessling, M., Wiestler, O.D. (1997) Neurodegenerative Erkrankungen. In: Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Hrsg) Pathologie, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, S. 289-291

Kontush, A., Finckh, B., Karten B., Kohlschütter, A., Beisiegel, U. (1996) Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Research* 37: 1436-1448

Kontush, A., Hübner C., Finckh, B., Kohlschütter, A., Beisiegel, U. (1996) How Different Constituents of Low Density Lipoprotein Determine its Oxidizability by Copper: A Correlational Approach. *Free Rad. Res.* 24: 135-147

Kontush, A., Meyer, S., Finckh, B., Kohlschütter, A. and Beisiegel U. (1996) Alpha-Tocopherol as a Reductant for Cu(II) in Human Lipoproteins *J. Biol. Chem.* 271: 11106-11112

Kontush, A., Spranger, T., Reich, A., Baum, K., Beisiegel, U. (1999) Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: the role of α -carotene and gamma-tocopherol. *Atherosclerosis* 144: 117-122

Kontush, A., Weber, W., Beisiegel, U. (2000) Alpha- and beta-Carotenes in low density lipoproteins are the preferred target for nitric oxide-induced oxidation. *Atherosclerosis*. 148: 87-93

Koppal, T., Subramaniam, R., Drake, J., Prasad, M.R., Dhillon, H., Butterfield, D.A. (1998) Vitamin E protects against Alzheimer's amyloid peptide (25-35)-induced changes in neocortical synaptosomal membrane lipid structure and composition. *Brain Research* 786: 270-273

Krinsky, N. I. (1992) Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200: 248-254

Lang, J.K., Gohil, K., Packer, L. (1986) Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinol and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. *Anal. Biochem.* 157: 106-116

Lepage, G., Roy, C.C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27: 114-119

Löffler, G., Petrides, P. E. (Hrsg) (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Lönnrot, K., Metsä-Ketelä, T., Molnár, G., Ahonen, J.-P., Latvala, M., Peltola, J., Pietilä, T., Alho, H. (1996) The effect of ascorbat and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity, *Free radical Biol. and Med.* 21: 211-217

Lovell, M.A., Ehmann, W.D., Butler, S.M., Markesbery, W.R. (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer`s disease, *Neurology* 45: 1594-1601

Markesbery, W.R. (1997) Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer`s Disease, *Free Rad. Biol. & Med.*, Vol. 23: 134-147

Mascio, P.D., Murphy, M.E., Sies, H. (1991) Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 53: 194-200

Mecocci, P., MacGarvey, U., Beal, M.F. (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer`s disease. *Ann. Neurol.* 36: 747-751

Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M, Rice-Evans, C.A. (1996) Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384: 240-242

Monnier, V.M., Cerami, A. (1981) Nonenzymatic browning in vivo: Possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211: 491-493

Motchnik, P., Frei, B., Ames, B.N. (1994) Measurement of Antioxidants in Human Blood Plasma. *Methods Enzymol.* 234: 269-279

Mummenthaler, M. (1997) Kortikale Demenzen In: Mummenthaler, M., Mattle, H. (Hrsg) *Neurologie*, Georg Thieme, Stuttgart, New York, 10. vollständig neubearb. Aufl., S. 380-386

Münch, G., Simm, A., Double, K.L., Riederer, P. (1996) Oxidative Stress and advanced Glycation Endproducts. Parts of a Vicious Circle of Neurodegeneration? *Alzheimer`s Disease Review* 1: 71-74

Nicki, E. (1987) Antioxidants in Relation to Lipid Peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* 44: 227-253

Palozza, P., Moualla, S., Krinsky, N.I. (1992) Effects of β -Carotene and α -Tocopherol on Radikal-Initiated Peroxidation of Microsomes. *Free Radical Biology & Medicine* 13: 127-136

- Pappert, E.J., Tangney, C.C., Goetz, C.G., Ling, Z.D., Lipton, J.W., Stebbins, G.T., Carvey, P.M. (1996) Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal fluid of Parkinson`s disease patients: Dose-response study and correlation with plasma levels. *Neurology* 47:1037-1042
- Radi, R., Bush, K.M., Cosgrove, T.P. and Freeman, B.A. (1991) Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 117-125
- Regnström, J., Ström, K., Moldeus, P., Nillson, J. (1993) Analysis of lipoprotein diene formation in human serum exposed to copper. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.19, No. 4: 267-278
- Sano M., Ernesto C, Thomas R.G., Klauber M.R., Schafer K., Grundman M., Woodbury P., Growdon J., Cotman C.W., Pfeiffer E., Schneider L.S., Thal L.J. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer`s disease. *N Engl J Med* Vol.336: 1216-1222
- Schnitzer, E., Pinchul, I., Fainaru, M., Schafer, Z., Lichtenberg, D. (1995) Copper-induced Lipid Oxidation in Unfractionated Plasma: The Lag preceding Oxidation as a Measure of Oxidation-Resistance. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216: 854-861
- Sevanian, A., Davies, K.J.A. and Hochstein, P. J. (1985) Conservation of vitamin C by uric acid in blood. *Free Radicals Biol. and Med.* 1: 117-124
- Sevanian, A., Davis, K., Hochstein, P. (1991) Serum Urat as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 54: 1129-1134
- Sims, N.R. (1996) Energy Metabolism, Oxidative Stress and Neuronal Degeneration in Alzheimer`s Disease. *Neurodegeneration*, 5: 435-440
- Smith, M.A., Sayre, L.M., Monnier, V.M., Perry, G. (1995) Radical Ageing in Alzheimers`s disease. *Trends Neurosci.* 18: 172-176
- Smith, M.A., Sayre, L.M., Perry, G. (1996) Is Alzheimer`s a disease of oxidative stress? *Alzheimer`s Disease Review* 1: 63-67
- Stocker, R. (1994) Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Current Opinion. Lipidology* 5: 422-433

Stocker, R., Bowry, V.W., Frei, B. (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 1646-1650

Stocker, R., Frei, B. (1991) Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In: Sies H. (Hrsg) *Oxidative Stress*. Academic Press, London

Stocker, R., Glazer, A.N. and Ames, B.N. (1987) Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 5918-5922

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh A.F., Glazer, A.N. and Ames B.N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235: 1043-1046

Stocks, J., Gutteridge, J. M. C., Sharp, R. J., Dormandy, T. L. (1974) The inhibition of lipid autoxidation by human serum and its relation to serum proteins and α -tocopherol. *Clin. Sci. Mol. Med.* 47 (3): 223-233

Subbarao, K.V., Richardson, J.S., Anf, L.C. (1990) Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increased peroxidation in vitro. *J. Neurochem.* 55: 342-345

Takeda, A., Yasuda, T., Miyata, T., Mizuno, K., Li, M., Yoneyama, S., Horie, K., Maeda, K., Sobue, G. (1996) Immunohistochemical study of advanced glycation end products in aging and Alzheimer's disease brain. *Neurosci. Letters* 221: 17-20

Thompson, C.M., Markesbery, W.R., Ehmann, W.D., Mao, Y.-X., Vance, D.E. (1988) Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 9: 1-8

Tohgi, H., Abe, T., Nakanishi, M., Hamato, F., Sasaki, K., Takahashi, S. (1994) Concentrations of α -tocopherol and its quinone derivate in cerebrospinal fluid from patients with vascular dementia of the Binswanger type and Alzheimer type dementia. *Neurosci. Letters* 174: 73-76

Trotman, B.W., Roy-Chowdhury, J., Wirt, G.D., Bernstein, S.E. (1982) Azodipyrroles of Unconjugated and Conjugated Bilirubin Using Diazotized Ethyl Anthranilate in Dimethyl Sulfoxide. *Anal. Biochem.* 121: 175-180

Urano, S., Asai, Y., Makabe, S., Matsuo, M., Izumiyama, N., Ohtsubo, K., Endo, Toyoshige (1997) Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense system in rats, and its prevention by vitamin E. *Eur. J. Biochem.* 245: 64-70

Waters, R.E. 2nd, White, L.L., May, J.M. (1997) Liposomes Containing α -Tocopherol and Ascorbat are Protected from External Oxidant Stress. *Free Radical Research* 26: 373-379

Wayner, D., Burton, G., Ingold, K., Locke, S. (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem. Biophys. Acta* 924: 408-419

Vatassery, G.T., Nelson, M.J., Maletta, G.J., Kuskowski, M.A. (1991) Vitamin E (tocopherols) in human cerebrospinal fluid. *Am J Clin Nutr* 53: 95-99

Vincent, S.H., Grady, R. W. Shaklai N., Snider J. M., Müller-Eberhard, U. (1988) The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 539-550

Danksagung

Ich danke dem Labor-Team für die herzliche Betreuung, insbesondere Anatol. Für Kritik und Unterstützung gilt mein Dank Mariam und Gehad, meinen Eltern, Christian, Sven und vor allem Iris.

Lebenslauf: Amaar Ujeyl

- geboren am 28.02.1975 in Wilhelmshaven
- 1981-85 Besuch der Grundschule in Rüstersiel, Wilhelmshaven
- 1985-87 Besuch der Orientierungsstufe der Schule Altengroden, Wilhelmshaven
- 1987-94 Besuch des Max-Planck-Gymnasiums, Wilhelmshaven
- 1994 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
- 1994 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
- 1997 Physikum
- 1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2000 Hochschulwechsel an die Humboldt-Universität in Berlin
- 2000/2001 Praktisches Jahr
- 2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Erklärung

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