

Aus dem Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Abteilung molekulare Zellbiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Universität Hamburg
Direktorin Frau Prof. Dr. Dr. h. c. U. Beisiegel

**Lipoproteinoxidation im Liquor cerebrospinalis bei der Alzheimer-
Krankheit und anderen Demenzformen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Haroon Nawid
aus Kandahar

Hamburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität
Hamburg am: 21.12.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Frau Prof. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Glatzel

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Herr PD. Dr. S. Arlt

Inhaltsverzeichnis

1 Zielsetzung der Arbeit	5
2 Einleitung	6
2.1) Morbus Alzheimer	6
2.1.1) Klinik	6
2.1.2) Epidemiologie	6
2.1.3) Ätiologie	7
2.1.4) Pathologie	9
2.1.5) Diagnose	10
2.1.6) Therapeutische Ansätze	11
2.2) Andere dementielle Erkrankungen	13
2.2.1) Vaskuläre Demenzen	13
2.2.2) Morbus Parkinson	14
2.2.3) Lewy Body Disease	15
2.3) Freie Radikale und biologische Rolle des oxidativen Stress	16
2.4) Lipidperoxidation	17
2.5) Antioxidantien im Liquor	18
2.5.1) Ascorbat (Vitamin C) im Liquor	19
2.5.2) α -Tocopherol (Vitamin E) im Liquor	19
2.6) Lipoproteine und Fettsäuren im Liquor	20
2.6.1) Lipoproteine	20
2.6.2) Fettsäuren	21
2.7) Oxidation von Lipoproteine im Liquor	22
2.7.1) Initiation	24

	4
2.7.2) Lagphase	24
2.7.3) Propagationsphase	25
2.7.4) Plateauphase	25
3 Materialien und Methoden	26
3.1) Materialien und Geräte	26
3.2) Messung der Oxidationskinetik mit dem Photometer	27
3.3) Vitamin C-Messung mit dem Photometer	28
3.4) Vitamin E-Messung mit dem HPLC	28
3.5) Messung der Fettsäuren und des Cholesterins mit dem GC	29
3.5.1) Basische Methylierung der Fettsäuren und des Cholesterins	29
3.6) Charakterisierung der Patienten	30
3.7) Statistische Programme und Verfahren	32
4) Ergebnisse	33
4.2) Oxidationskinetik	33
4.2.1) Lipoproteinoxidation im Liquor	33
4.2.2) Vitamin C- und E- Konzentration im Liquor	37
4.2.3) Cholesterin und Fettsäuren im Liquor	40
5 Diskussion	46
6 Zusammenfassung	52
7 Literaturverzeichnis	53
8 Danksagungen	58
9 Erklärung	59

1 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Entstehung der Atherosklerose spielt die Veränderung der Lipoproteine im Plasma durch oxidativen Stress eine wesentliche Rolle. Es ist mittlerweile auch schon erwiesen, daß oxidativer Stress und somit die Oxidation von Lipoproteine im Liquor eine wichtige Rolle spielt. Ob und inwiefern eine oxidative Modifikation der Liquorlipoproteine bei der Entstehung von anderen dementiellen Erkrankungen eine Rolle spielt, soll bei der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

1. Spielt der oxidative Stress und somit die oxidative Modifikation der Lipoproteine im Liquor auch eine Rolle bei der Entstehung von anderen dementiellen und neurodegenerativen Erkrankungen?
2. Inwiefern haben Antioxidantien wie Ascorbat und α -Tocopherol einen Einfluß auf den Oxidationsverlauf von Liquorlipoproteinen?

Um der Fragestellung nachzugehen, werden Untersuchungen am menschlichen Liquor von 36 Alzheimer-Patienten sowie als Vergleich ein Kollektiv von 7 Patienten, die an anderen dementiellen und neurodegenerativen Erkrankungen leiden, unternommen.

Der Liquor wird *in vitro* oxidiert und dabei verschiedene Oxidationsparameter, wie die Entstehung der konjugierten Dienen, die Oxidationskinetik, Verbrauch von Antioxidantien wie Ascorbat und α -Tocopherol während der Oxidation, sowie die Konzentrationen von Fettsäuren und Cholesterin gemessen.

2 EINLEITUNG

2.1 Morbus Alzheimer

Alois Alzheimer beschrieb 1906 erstmals einen Fall von präseniler Demenz bei einer 51-jährigen Frau. 1910 wurde die Alzheimer Krankheit von Kraepelin geprägt. Im Jahre 1911 faßte auch Alzheimer präsenile und senile Demenz aufgrund fehlender klinischer oder morphologischer Unterschiede als ein Krankheitsbild zusammen, das seitdem als Alzheimer Krankheit bezeichnet wird.

2.1.1 KLINIK

Die Alzheimer Krankheit (Alzheimer's Disease, AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch durch einen progressiven Demenz bemerkbar macht. Die Hauptkennzeichen der Demenz sind kognitive und geistige Verarmung und ein Fehlen der geistigen Fitneß im Denken, was zu unangemessenem Denken und Verhalten führt. Es kommt zu einem fortschreitenden Verlust der kortikalen Funktionen, wie das Kurzzeitgedächtnis, die zeitliche und räumliche Orientierung, sowie später auch das Langzeitgedächtnis, die Sprache und das Assoziationsvermögen. Bisher ist eine erfolgreiche Therapie oder gar Heilung der Erkrankung nicht möglich und so führt sie letztendlich, u.a. durch sekundäre Erkrankungen (z.B. Pneumonie), zum Tod des Patienten. Die Diagnose der AD kann bisher nur erst postmortem sicher festgestellt werden (Lang, 1994).

2.1.2 EPIDEMIOLOGIE

AD ist die häufigste degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die häufigste Ursache für Demenz und nach Herzinfarkt, Krebs und Schlaganfall ist die AD die vierthäufigste Todesursache in den Industriestaaten. Ungefähr 50-70% der Demenzerkrankungen wird durch AD hervorgerufen (Lang, 1994). Mit dem Alter nimmt auch die Häufigkeit der Erkrankung stark zu und zeigt in der Altersgruppe der 80-bis 89jährigen eine Prävalenzrate von 10,8% (Tabelle 1). Bei einem Beginn der Erkrankung in einem Alter von 65 oder älter wird sie als Late-onset Alzheimer's Disease (LOAD) und in einem jüngeren Alter als Early-onset AD (EOAD) bezeichnet (Sandbrink und Beyreuter, 1997). Das relative Risiko, an einer sogenannten präsenilen Demenz (EOAD) zu erkranken, wird für die Bundesrepublik mit 0,1% angegeben (Masuhr et. al., 1998).

Altersgruppe	Prävalenz (%)
30-59	0,02
60-69	0,3
70-79	3,2
80-89	10,8

Tabelle 1: Prävalenz der AD in europäischen Ländern
(nach Rocca et al., 1991)

2.1.3 ÄTIOLOGIE

Die Ätiologie der AD ist bisher noch nicht ganz geklärt. Ein Großteil der Fälle von AD hat eine multifaktorielle Ätiologie, in der sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Faktoren eine Rolle spielen. Zu den genetischen Faktoren zählen Mutationen, die zur AD führen und genetische Risikofaktoren, die zwar alleine nicht ausreichen aber pathogenetische Mechanismen begünstigen, um die Krankheit hervorzurufen.

Ein genetischer Risikofaktor für die AD ist das Allel 4 des Gens für Apolipoprotein E (Apo E). Das Apo E existiert in verschiedenen Varianten (Apo E 2, 3 und 4) und ist auch Bestandteil der Apolipoproteine VLDL, HDL und Chylomikronen. Hauptsyntheseorte sind die Leber, die Astrocyten im Gehirn sowie die Schwann-Zellen peripherer Nerven (Mielke et al., 1994; Lautenschlager et al., 1999). Ihre Funktion besteht im Transport und die Rezeptorvermittelte Aufnahme von Lipoproteinen in der Leber. Im Gehirn spielt Apo E eine wichtige Rolle in der Wiederaufnahme und Verteilung von Cholesterin und Phospholipiden während der Regenerations- und Reparaturvorgängen in Nervenzellen (Weisgraber, 1994; Mielke et al., 1994; Lautenschlager et al., 1999). Man vermutet, daß Apo E 2-Allel eine protektive Funktion bei der AD ausübt, wohingegen meistens mit einer Apo E 4-Allel das Risiko an AD (Late-onset AD, LOAD) zu erkranken erhöht ist (Iqbal et al., 1995). Die Apo E 4-Allele erhöhen das Risiko zur LOAD (Corder, 1993). Das Risiko ab dem Alter von 65 Jahren an Alzheimer zu erkranken liegt im Durchschnitt bei 15%, erhöht sich bei Trägern eines E 4 Allels auf 30% und beträgt bei Individuen ohne E 4 Allel nur noch 9% (Seshadri et al., 1995). Dabei ist auch ein Gendosiseffekt zu beobachten. Jedes vorhandene E 4 Allel senkt das statistisch wahrscheinliche Alter bei dem die Erkrankung auftritt um 4 bis 5 Jahre (Lovestone, 1999).

Die drei Allele des Apo E-Gens befinden sich auf dem Chromosom 19. Die Häufigkeit des Allelfrequenzen von Apo-E4 liegt bei gesunden Personen bei ca. 10% und bei AD-Patienten bei über 30% (Tabelle 2).

Apo E Allel	Patienten n=308	Kontrollen n=105	Chi-quadrat p
ε2	0,05	0,12	<0,01
ε3	0,64	0,78	<0,01
ε4	0,31	0,10	<0,01

Tabelle 2: Apo E-Allelfrequenzen von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen (nach Kurz und Müller, 1997)

Weisgraber (1994) und Roses (1996) zeigten in einer Studie die Verteilung der drei Allele ε2, ε3 und ε4 in der Bevölkerung. Das Allel ε2 war mit 7%, ε3 mit 78% und ε4 mit 15% in der Bevölkerung vertreten.

Die Ursache der vererbaren AD sind drei Genmutationen auf drei verschiedene Chromosomen. Dabei handelt es sich um das APP-Gen (Amyloid-Precursor-Protein) auf Chromosom 21 sowie um die Gene Präsenilin 1 auf Chromosom 14 und Präsenilin 2 auf Chromosom 1 (Tabelle 3). Je nach dem wo die Mutation lokalisiert ist, kommt es zu einer Steigerung der Produktion des βA4-Proteins, welches in der Alzheimer Pathologie eine Rolle spielt, und zu einer vermehrten Produktion des langen βA4-Fragments (Aβ 1-42). Die erbliche Formen der AD, bei denen ein autosomal dominanter Erbgang mit häufig kompletter Penetranz auftritt, wird auch als familiärer AD (engl. Familial Alzheimer's Disease, FAD) bezeichnet. Die familiäre AD (FAD) führt in der Regel zu einem frühen Erkrankungsbeginn vor dem 60. Lebensjahr (Early onset AD, EOAD) (Sandbrik und Beyreuther, 1997).

Die Lokalisation des APP-Gens auf Chromosom 21 erklärt, warum Menschen mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) häufiger und früher an der AD erkranken als andere Menschen. Es wurde festgestellt, daß die Demenz und identische Gehirnveränderungen, wie sie bei der AD vorkommen, auch bei Patienten mit Down-Syndrom auftreten. Das Risiko bei Patienten mit Trisomie 21 an einer AD zu erkranken ist somit deutlich erhöht (Wisniewski et al., 1985).

Auch der oxidative Stress, worauf in Kapitel 1.3 näher eingegangen wird, wird in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung diskutiert. Freie Radikale sind sehr reaktionsfreudig und können biologische Strukturen im Organismus wie z.B. DNA oder Proteine schädigen. Heute weiß man, daß oxidative Modifikationen organischer Strukturen sowohl im Gehirn von Alzheimer-

Patienten als auch bei anderen neurodegenerative Erkrankungen (z.B. Parkinson) eine wichtige Rolle spielen.

Betroffenes Gen	Chromosom	Protein	Krankheitsbeginn	Anteil der Fälle
APP-Gen	21	APP	43-62 J.	<1%
Präsenilin 1	14	PS 1	33-60 J.	5-10%
Präsenilin 2	1	PS 2	44-77 J.	2-3%

Tabelle 3: An der Alzheimer Krankheit beteiligte Gene (Lautenschlager et al., 1999)

2.1.4 PATHOLOGIE

Bei der AD findet man makroskopisch eine Hirnatrophie vor allem in den Regionen des Frontal- und Temporalhirns, sowie im Hippocampus. Diese Hirnatrophien werden verursacht durch den Verlust von synaptischen Verbindungen und den Untergang von Neuronen. Histopathologisch lassen sich bei der AD intrazelluläre Neurofibrillenbündel (Neurofibrillary tangles, NFT) und extrazelluläre Amyloidablagerungen (Plaques) nachweisen.

Die Plaques bestehen aus dem β -Amyloid, ein proteolytisches Abbauprodukt des β A4-Amyloid-Vorläuferproteins (Amyloid Precursor Protein, APP) (Selkoe et al. 1994). Das APP ist ein integrales Membranprotein, dessen Funktion noch nicht geklärt ist. Man vermutet, daß es eine Rolle bei der Bildung synaptischer Kontakte zwischen Zellen, beim Neuritenwachstum und bei der Regulation des intraneuronalen Kalziums spielt (Lautenschlager et al. 1999). Das β A4-Protein aggregiert außerhalb der Nervenzelle mit weiteren β A4-Molekülen zu den sogenannten amyloiden Plaques (Sandbrink und Beyreuther, 1997). Die β A4-Freisetzung aus dem Vorläuferprotein ist ein physiologischer Prozeß, der im Hirn eines jeden Menschen abläuft. Proteine wie β A4 werden in der Regel von Enzymen abgebaut oder mit Hilfe großer Proteinkomplexe aus dem Gehirn abtransportiert, so daß keine Plaques entstehen können. Warum bei der AD β A4-Proteine zu Plaques aggregieren, ist weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden mehrere Mechanismen. Das β A4-Protein hat normalerweise eine Länge von 40 Aminosäuren (β A4-40). Bei AD

werden vermehrt die längeren Proteinfragmente von 42 und 43 Aminosäuren (β A4-42/43) synthetisiert. Diese haben eine stärkere Neigung sich aneinander zu lagern als das physiologische Spaltprodukt und bilden so den Hauptbestandteil der amyloiden Plaques. Wesentlich scheint für die Plaquetbildung eine Strukturänderung des β A4-Proteins zu sein. Vor seiner Freisetzung aus dem APP hat das β A4 vermutlich eine α -helikale Struktur. Innerhalb der Plaques liegt es jedoch als β -Faltblatt vor, das im Gegensatz zur α -Helix extrem stabile Aggregate mit sich selbst bildet. Auch ein gestörter Abbau oder ein gestörter Abtransport sowie eine katalytische Wirkung von Radikalen werden als Pathomechanismen in Erwägung gezogen.

Die NFT's, die ebenfalls charakteristisch bei AD sind, bestehen hauptsächlich aus dem Tau-Protein. Die physiologische Funktion von Tau besteht in der Stabilisierung von Mikrotubuli, welche für den Stofftransport innerhalb von Neuronen verantwortlich sind.

Bei der AD wird nun das Tau-Protein verstärkt phosphoryliert (Selkoe 1999; Lautenschlager et al., 1999). Dieses führt dazu, daß Tau seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli verliert und dimere Komplexe bildet. Die unlöslichen NFT's entstehen aus diesen Komplexen, die sich zu paarigen helikalen Filamenten ablagern. Durch den Verlust der Bindungsfähigkeit von Tau an die Mikrotubuli, werden diese destabilisiert und der Stofftransport in den Nervenzellen ist gestört (Lautenschlager et al. 1999).

Allerdings sollte man erwähnen, dass amyloide Plaques auch normal gealterte Menschen im hohen Lebensalter aufweisen, der Unterschied liegt in der Menge. Auch sind NFT's und das Tau-Protein nicht spezifisch für die AD, da sie auch bei anderen Neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Morbus Pick) nachweisbar sind.

2.1.5 DIAGNOSE

Die frühe Diagnose der AD ist wegen der Differentialdiagnose zu anderen Neurodegenerativen Erkrankungen sehr schwer zu stellen. Für die Frühdiagnose AD wurden in den letzten Jahren spezielle neuropsychologische Tests, strukturell und funktionell bildgebende Untersuchungen und klinisch-chemische Marker entwickelt. In der Frühphase der Erkrankung sind allerdings die bildgebenden Verfahren, wie Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie (CT) oder Elektroenzephalographie (EEG), sehr wenig hilfreich. Erst im Spätstadium können sich z.B. im CT oder MRT Hinweise auf eine AD zeigen. In den letzten Jahren wurde unter anderen ein rasch durchzuführendes Demenzscreening vorgestellt, das eine verbale Gedächtnisaufgabe mit Hinweisreizen und Tests für die zeitliche Orientierung sowie die verbale Flüssigkeit enthält und auch leicht betroffene hinreichend sicher erfassen soll. Wichtig ist allerdings die Abgrenzung von anderen

dementiellen Syndromen (Tabelle 4), was sich ebenfalls als schwierig darstellt.

Vor allem kann die Unterscheidung zwischen AD und vaskulären Demenzen ein sehr schwieriges Problem sein, zumal hier auch Mischformen existieren und diese nie völlig auszuschließen sind. So kann die absolut sichere Diagnose einer AD nach wie vor nur postmortem histologisch am Hirngewebe festgestellt werden.

2.1.6 Therapeutische Ansätze

Eine ursächliche Behandlung der AD gibt es bisher noch nicht. In den letzten Jahren wurden aber Medikamente entwickelt, die das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen. Insbesondere, wenn sie bereits früh bei leichter oder mäßiger Ausprägung der Erkrankung eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um im Hirn wirksame Acetylcholinesterasehemmer (z.B. Tacrin, Donepezil, Rivastigmin, etc.). Der Krankheitsprozeß verursacht durch den progredienten Untergang von Nervenzellen unter anderem einen Mangel am Neurotransmitter Acetylcholin (ACh). Solange aber noch wenigstens einige ACh-produzierende Neurone vorhanden sind, bewirkt eine Hemmung des Abbaus von ACh, daß seine Verfügbarkeit gesteigert wird. In Therapiestudien wurden Verbesserungen von kognitiver Leistungsfähigkeit, Alltagskompetenz und eine Reduktion von Verhaltensstörungen unter der Behandlung mit derartigen Medikamenten nachgewiesen. Zu betonen ist aber nochmals, daß diese Effekte am deutlichsten in frühen Stadien der Erkrankung sind, was die Notwendigkeit einer Frühdiagnose unterstreicht. Unter den übrigen Therapieansätzen hat die Östrogen-Ersatztherapie für erkrankte Frauen nach der Menopause offenbar einen deutlichen Effekt mit Verbesserung sprachlicher sowie amnestischer Leistungen. Das Risiko für das Auftreten einer AD soll zudem durch eine derartige Substitution gesenkt werden. Entzündungshemmende Substanzen (z.B. nicht-steroidale Antirheumatika, Prednison) können vielleicht die Schädigung des umgebenden Hirngewebes durch die Plaques mindern. Untersucht wird auch, ob cholesterinsenkende Medikamente wie die Statine, zumindest bei Patienten mit dem Risiko-Allel des Apo E4, die Ausbildung von Plaques reduzieren können. Neuere epidemiologische Studien belegten, dass Patienten mit Statinen eine reduzierte Alzheimereraten hatten, und nach Daten anderer Interventionsstudien können hirngängige Statine wie Simvastatin offenbar den Beginn einer AD bei leicht kognitive Einschränkungen (mild cognitive impairment, MCI) verzögern (Müller, Ärzte Zeitung, Okt. 2010).

Studien der letzten Zeit geben Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen AD und Insulinresistenz im Gehirn. Mit Hilfe eines PET-Verfahrens wurden die Plaques bei Alzheimer-Patienten im Hirn sichtbar gemacht. Diese korrelieren zum Teil sehr gut mit den Regionen, die einen reduzierten

Glucosestoffwechsel bei Diabetikern aufweisen. Vermutlich geht eine Glucosestoffwechselstörung einer toxischen Plaquebildung voraus.

Tests bei Gesunden zeigt, dass intranasal verabreichtes Insulin die kognitiven Leistungen verbessert. In Zellkulturen konnte Insulin die Plaquebildung in Neuronen bremsen. Der Effekt lässt sich verstärken, wenn die Insulinsensitivität durch Glitazone (Antidiabetika) erhöht wird. Studien mit Glitazonen deuten bei leicht eingeschränkten, kognitiven Patienten oder leichtem Alzheimer auf eine Verbesserung der Kognition. Bei etwas fortgeschrittenem Alzheimer zeigten die Antidiabetika keinen klinischen Effekt. Möglicherweise ist in solchen Stadien die Zerstörung im Gehirn zu weit fortgeschritten, als dass diese Medikamente noch effektiv sein könnten (Geldmacher et. al., Arch. of Neurology, 2011).

Nicht nur β -Amyloid sondern auch Tau-Protein bildet bei Alzheimer Plaque-Ablagerungen im Gehirn. Forscher haben nun eine Substanz klinisch erprobt, die die Bildung von Neurofibrillen aus Tau-Protein verhindern soll. Die Studie mit dem GSK-3-Hemmer Tideglusib zeigte, dass bei Alzheimer-Patienten Kognition und Alltagsfunktion verbesserte. Aufgrund der kleinen Teilnehmerzahl waren aber die Unterschiede zu Placebo nicht signifikant. Die GSK-3 (Glycogen-Synthase-Kinase 3) induziert die Hypophosphorylierung von Tau-Protein, das anschließend zu Neurofibrillen verklumpt. Forscher gehen davon aus, das GSK-3 von β -Amyloid aktiviert wird. Umgekehrt konnte in Experimenten die Hemmung von GSK-3 auch die β -Amyloid-Produktion drosseln.

Zur Vorbeugung ideal wären Medikamente, die die Produktion des β A4-Proteins reduzieren oder die Ausbildung einer β -Faltblatt-Struktur hemmen können.

Mit und ohne Medikation sind alle Hilfen wichtig, die dem betroffenen Menschen erlauben, seine Selbständigkeit möglichst lange zu erhalten. Dazu zählen Übungstherapien im neuropsychologischen und ergotherapeutischen Bereich ebenso, wie die Ausarbeitung strukturierter Tagespläne und die Anpassung der unmittelbaren Umgebung an die Fähigkeiten und Bedürfnissen des Patienten. Ohne die pflegenden Angehörigen ist die Betreuung und Versorgung von Alzheimer-Patienten kaum denkbar und für die Gesellschaft nicht finanzierbar.

2.2 Andere dementielle Erkrankungen

Die AD differentialdiagnostisch von anderen dementiellen Erkrankungen zu unterscheiden ist schwierig. Insbesondere in der Frühphase einer Demenz ist Aufgrund häufig fehlender zusätzlicher Symptome schwer diese Demenz einer AD oder einer anderen neurodegenerativen Erkrankung zuzuordnen.

Tabelle 4 zeigt die relative Häufigkeit verschiedener Demenzen.

Form	Häufigkeit bei Autopsien
Alzheimer-Demenz	50-70%
Vaskuläre Demenz	10%
Mischformen Alzheimer-vaskulär	10%
M. Pick	0,5-2%
Diffuse Lewy-Körperchen-Erkrankung	1-5%
M. Parkinson (ca. 30% der Erkrankten Entwickeln eine Demenz)	4%
Andere	6-7%
ohne morphologisches Korrelat	0,3-2%

Tabelle 4 Relative Häufigkeit verschiedener Demenzformen (nach Hülser, 2001)

2.2.1 Vaskuläre Demenzen

Vaskuläre Erkrankungen zählen zu den nächsthäufigsten Ursachen für die Entstehung von Demenzen nach der AD. In großen Autopsie-Serien liegen die Prozentzahlen für die rein vaskulären Demenzen ohne Alzheimer-typische-Läsionsmuster bei 9% (Boller et al., 1989) bis 59% (Homer et al., 1988), für histopathologische Mischformen bei 4% (Boller et al., 1989) bis 23% (Malamud, 1972). Die Symptomatik der vaskulären Demenz gegenüber der AD unterscheidet sich klinisch kaum, lediglich im Verlauf nimmt die Demenz vom vaskulären Typ eher einen fluktuierenden Verlauf. Außerdem finden sich bei Demenz vom vaskulären Typ häufiger fokale neurologische Symptome, die das Korrelat von kleinen Schlaganfällen darstellen. Klinische Risikofaktoren für die Entstehung von Demenz vom vaskulären Typ entsprechen denen für die kardiovaskuläre Erkrankungen, wie z.B. die Hypertonie, der Diabetes mellitus, die Hypercholesterinämie sowie das Rauchen. Die Demenz vom vaskulären Typ ist ein noch heterogeneres Erkrankungsbild als

die vom Alzheimer-Typ. Man unterscheidet vom histopathologischen Erscheinungsbild zwei größere Unterformen, einerseits die sogenannte "Multiinfarkt-Demenz", die auf vielfältige kleine Schlaganfälle im Hirnrindengebiet beruht. Sobald das Gesamtvolumen dieser ausgefallenen Hirngebiete ein bestimmtes Volumen überschreitet oder aber Hirngebiete mit zentral wichtiger Funktion ausgefallen sind, kommt es zur Symptomatik einer Demenz.

Eine Demenz kann aber auch auftreten, wenn die subkortikalen Leitungsbahnen entweder durch Unterbrechung der Blutversorgung oder aber durch chronische Mangelversorgung geschädigt werden. Dann entsteht das Bild der sogenannten subkortikalen arteriosklerotischen Enzephalopathie, die auch Morbus Binswanger genannt wird. Aus der Unterbrechung der Blutversorgung oder einer chronischen Mangelversorgung resultiert eine Blockierung bzw. eine Minderung der Substratzufuhr, was zu charakteristischen Veränderungen im Zellmetabolismus führt. Bedingt durch den Glukose- und Sauerstoffmangel kommt es zum Anstieg der Laktatproduktion sowie zu einer verminderten Energiebildung. Die Neurotransmitterbildung wird eingeschränkt, hiervon ist besonders die Acetylcholinbildung betroffen. Des weiteren kommt es zu einer zunehmenden Überflutung der Zelle mit Kalzium im Zellinnern, Glutamat wird im Extrazellulärraum freigesetzt und führt zu einer weiteren Überflutung der Zelle mit Kalzium. Letztlich resultieren hieraus eine Aktivierung einer Vielzahl von zellabbauenden Enzymsystemen sowie eine zunehmende Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die die Zellmembranen schädigen.

2.2.2 Morbus Parkinson

Die Parkinson Krankheit gehört ebenfalls zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Hier liegt ein degenerativer Prozeß der Neuronen der Substantia nigra vor, bei der es zu einer verminderten Produktion des Neurotransmitters Dopamin vor allem im Putamen des nigrostriatalen Systems der Basalganglien kommt. Der Dopaminmangel führt zu den typischen Bewegungsstörungen mit den Trias Rigor, Tremor und Akinese (Brandt et al., 1993). Bei einer Minderzahl der Erkrankten kommt auch eine dementielle Entwicklung vor. Ob die Demenz des Morbus Parkinson aufgrund einer Multitransmitterfunktionsstörung beruht oder ob gleichzeitig eine AD vorliegt, läßt sich erst postmortem sicher feststellen. Die Parkinson-Syndrome stellen die Gruppe der häufigsten Basalganglien-Erkrankungen dar. Die Altersverteilung zeigt einen deutlichen Gipfel im siebten bis achten Lebensjahrzehnt.

Alter	Häufigkeit
<54	5/100000
55-64	32/100000
65-74	113/100000
75-84	254/100000

Tabelle 5 altersspezifische Häufigkeit des Morbus Parkinsons nach Rajput et al., 1984

Die genaue Ursache des Morbus Parkinson ist weiterhin noch unbekannt. Diskutiert werden genetische Faktoren. Aber auch freie Radikale spielen bei diesem Krankheitsbild eine wesentliche Rolle, da lokal ein oxidativer Streß abläuft, der zu neurologischen Störungen führt.

2.2.3 Lewy Body Disease

Auch die sogenannte diffuse Lewy Body Disease gehört zu den häufig vorkommenden Demenz-Erkrankungen. Bei Autopsiestudien wurden bei ca 15-25% der älteren Demenz-Patienten Lewy-Körperchen im Stammhirn, im Diencephalon, den Basalganglien und in der Hirnrinde diagnostiziert. Einige Autoren zählen die Lewy Body Disease sogar nach der AD zu den zweithäufigsten Demenzen. Diese Aussage konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden.

Die Lewy Body Disease macht sich durch eine Abnahme der geistigen Fähigkeit, Halluzinationen, Psychose und parkinsonähnliche Symptome bemerkbar. Man hat häufig auch alzheimer-typische Läsionen bei an Lewy Body erkrankten Patienten gefunden, was wiederum die Unterscheidung zu AD erschwert und somit auch zu falschen Diagnosen führen kann.

Lewy-Körperchen sind intrazytoplasmatische Einschlüsse in Neuronen bestehend aus veraltete Neurofilamente, deren Proteine diffuse Aggregate bilden. Diese Lewy-Körperchen werden typischerweise auch bei der Parkinson-Krankheit im Stammhirn, Hypothalamus und dem Nucleus Basalis Meynert gefunden. Die Ursache für die Bildung der Lewy-Körperchen ist nicht bekannt.

2.3 Freie Radikale und biologische Rolle des oxidativen Stress

Freie Radikale sind Zwischenprodukte im Stoffwechsel und definiert als ein Atom oder Moleküle, die in der äußeren Hülle ein oder mehrere ungepaarte Elektronen tragen (Halliwell et al., 1989). Durch diesen chemisch sehr unruhigen Status sind Radikale extrem reaktiv, da sie sofort versuchen wieder eine stabile Form anzunehmen, indem sie Substanzen in der unmittelbaren Umgebung angreifen. Um ihren Elektronenmangel auszugleichen, reagieren Freie Radikale mit körpereigenen Substanzen (z.B. Membranen). Sie lagern sich so an ein Molekül und entreißen diesem ein Elektron. So überträgt sich das Elektronendefizit von Sauerstoff auf das Molekül unseres Körpers, das damit selbst zum Freien Radikal wird. Dieses Radikal sucht nun seinerseits einen Reaktionspartner, dem es ein Elektron abnehmen kann. Somit entstehen weitere Radikale. Auf diese Weise wird eine Kettenreaktion ausgelöst, die zu Schädigung vieler Zellstrukturen und Verbindungen führt.

Die erste erkannte Reaktion in biologischen Systemen war die homolytische Dissoziation von Wasser durch ionisierende Strahlen, wobei zwei äußerst reaktive Radikale entstehen. Freie Sauerstoff-Radikale im lebenden Organismus sind sehr reaktiv und spielen im Metabolismus eine entscheidende Rolle. Zwei Prozent des Sauerstoffs, den wir einatmen, wird in das Superoxid-Anionen-Radikal umgewandelt, das durch Aufnahme eines Elektrons gebildet wird. Prozesse dieser Art finden vor allem in den Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und in den Phagocyten statt, wo Radikale benötigt werden, um Bakterien zu töten. Radikale haben somit nicht nur schädigende Wirkung, sondern dienen dem Organismus auch als Immunschutz. So werden unter bestimmten Umständen Freie Radikale sogar gezielt von den Körperzellen gebildet, um deren zerstörerische Eigenschaften zur Bekämpfung von Krankheitserregern zu nutzen.

Die zellschädigende Wirkung der Radikale wird auch z.B. bei der Tumorthherapie mittels Strahlentherapie oder Chemotherapeutika genutzt.

Die Bildung von Radikalen erfolgt kontrolliert durch enzymatische Prozesse oder unkontrolliert durch xenobiotische Prozesse (Tabakrauch, Medikamente, Gifte, UV-Strahlung, Röntgenstrahlung usw.).

Die schädigende Wirkung, die Sauerstoffradikale hervorrufen, hängt von der Art des Sauerstoffradikals ab. Das Hydroxylradikal, welches durch chemische oder physikalische Einwirkung auf molekularen Sauerstoff entsteht, ist das reaktivste Radikal, das wir kennen. Es hat eine extrem kurze Halbwertszeit und dadurch nur eine lokale Wirkung, was je nach Angriffsort bzw. Substrat entweder keinen biologischen Effekt hat, oder aber einen großen Schaden anrichten kann (z.B. Schädigung der Erbsubstanz bis zur Zellerstörung).

Die Bildung von Hydroxyl-Radikalen wird von den Metallionen Eisen und Kupfer katalysiert, so dass man diese freien Metalle auch als Radikale bezeichnet. Radikale greifen vorzugsweise die Desoxyribonukleinsäuren (führt z.B. zu falscher Sequenzablesung), die Eiweiße (führt z.B. zur Inaktivierung von Enzymen), die Kohlenhydrate (Depolymerisation) und die Fette (z.B. die PUFAs der Zellmembranen) an.

Die Anfälligkeit des Körpers gegenüber peroxidativem Schaden steht in Zusammenhang mit dem Gleichgewicht zwischen prooxidativer Leistung und der Angemessenheit oxidativer Abwehr. Oxidativen Stress nennt man ein Ungleichgewicht zugunsten der Prooxidantien [Traber et Sies, 1996].

Oxidativer Stress wird in Zusammenhang gebracht mit Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Atherosklerose, Alterungsprozesse, chronische Entzündungen, Krebs, etc..

Metalle sind wichtige Katalysatoren bei der Bildung freier Radikale. In der Vielzahl möglicher Metalle haben vor allem Eisen, Aluminium, Quecksilber, Kupfer und Zink für die Alzheimer-Erkrankung eine Bedeutung.

Der Eisengehalt in Gehirnen von Alzheimer-Patienten ist erhöht. Man findet Eisen, Transferrin und Ferritin in „senile Plaques“. Die Eisenverteilung im Gehirn entspricht bei Alzheimer-Patienten der Verteilung von senilen Plaques und Neurofibrillen [Smith et al. 1997]. Erhöhter Eisengehalt wird außerdem in β -Amyloid-Ablagerungen gefunden.

Coeruloplasmin ist zum einen das hauptsächliche Eisen(II)-oxidierende Enzym im ZNS, zum anderen ist es das zentrale kupferspeichernde Protein. In fünf Hirnregionen, vor allem dem Hippocampus findet man erniedrigte Kupferkonzentrationen bei AD-Patienten [Deibel et al. 1997].

Sowohl freies Eisen als auch Kupfer können mit Wasserstoffperoxid reagieren und das höchst reaktive Hydroxyl-Radikal bilden. Beide Metalle dürfen im menschlichen Körper nicht ungebunden vorkommen, sie sind fast immer an Transportproteine oder in Speicherproteinen gebunden.

2.4 Lipidperoxidation

Vor allem die in Cholesterinestern sowie in Phospholipide der Lipoproteine enthaltenen mehrfachungesättigten Fettsäuren (PUFAs = polyunsaturated fatty acids) wie Linolsäure [18:2] und Arachidonsäure [20:4] und die PUFAs der Zellmembranen sind empfindliche Angriffsorte der Freien Radikalen.

Die Lipidperoxidation verläuft in mehreren Stufen, der durch das Hydroxyl-Radikal oder durch das Superoxid-Radikal in Gegenwart von Metallionen ausgelöst wird.

Die besonders schädigende Wirkung der Radikale auf die PUFAs kommt dadurch zustande, weil die Doppelbindungen der PUFAs die benachbarten Kohlenwasserstoffbindungen (C-H) abschwächen und somit die Abspaltung eines H-Atoms durch ein Hydroxyl-Radikal erleichtert wird. Nach der Abspaltung des H-Atoms findet eine molekulare Umlagerung statt, wobei die Fettsäure nun die Struktur eines konjugierten Dienes aufweist (mit einem Absorptionsmaximum bei 234 nm). Nach Aufnahme von Sauerstoff entsteht das Lipid-Peroxidradikal [LOO•]. Dieses Radikal kann nun durch Abspaltung eines H-Atoms an einer weiteren ungesättigten Fettsäure zu einer Kettenreaktion führen, während es selber zum Lipidhydroperoxid [LOOH] wird. Diese sogenannte Autooxidation kann auch andere Angriffspunkte im Körper haben, z.B. Membranproteine, Cholesterin, DNA etc.. Durch Metallionen, auch Metallkatalyse genannt, reagiert das Lipidhydroperoxid entweder zu Alkoxy- und Peroxylradikalen oder es wird durch sekundäre Oxidation zu zelltoxischen Stoffen, wie 4-Hydroxinonenal (4-HNE) und Malondialdehyd (MDA) bzw. Thiobarbitursäureaktive Substanzen (TBARS) abgebaut.

Die ausgelöste Kettenreaktion kann unterbunden werden, indem Radikale miteinander reagieren oder durch sogenannte Radikalfängermolekülen, auch Antioxidantien genannt, neutralisiert werden.

2.5 Antioxidantien im Liquor

Der menschliche Körper verfügt über ein komplexes Abwehrsystem bestehend aus verschiedenen antioxidativen Substanzen, um sich vor den Angriffen durch oxidative Substanzen (Radikale) zu schützen. Die sogenannten Antioxidantien kommen sowohl in verschiedene Körperflüssigkeiten (Blutplasma, Liquor, Speichel, Sperma etc.), als auch Intrazellulär vor. Intrazellulär sind es vor allem Enzyme wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase, die antioxidativ wirken. In den Körperflüssigkeiten wie Plasma und Liquor kommen als antioxidative Substanzen Proteine (Albumin, Transferrin, Coeruplasmin etc.), hydrophile Antioxidantien (Ascorbat, Urat, Bilirubin) und lipophile Antioxidantien wie α - und γ -Tocopherol, Ubichinole sowie die Carotinoide α - und β -Carotin vor.

Antioxidantien (AO)		Blutplasma		Liquor	
Lipophile AO	α -Tocopherol	15-25	μM	56,7	nM
	Ubichinol-10	0,4-1,0	μM	nicht bekannt	
	β -Carotin	0,54	μM	1,9	nM
Hydrophile AO	Ascorbat	30-50	μM	193,4	μM
	Urat	160-450	μM	16-22	μM

Tabelle 6: Vergleich der wichtigsten lipophilen und hydrophilen Antioxidantien in Plasma und Liquor cerebros spinalis. [Stocker et al., 1991; Schippling et al., 1999]

2.5.1 Ascorbat (Vitamin C) im Liquor

Der Mensch gehört zu den wenigen Säugetieren, die Vitamin C nicht endogen produzieren können und es exogen mit der Nahrung zuführen müssen. Vitamin C ist das wichtigste hydrophile Antioxidans im menschlichen Organismus. Das Zentrale Nervensystem (ZNS) hat einen hohen Bedarf an Vitamin C, so dass es aktiv aus dem Blutkreislauf in den Liquorraum transportiert wird. So ist die Konzentration von Ascorbat im Liquor bis zu zehnmal höher als im Plasma. In den Gehirnzellen beträgt die Vitamin-C-Konzentration wiederum das Zehnfache der des Liquors und liegt somit bis zu 100fach konzentrierter als im Plasma.

Ascorbat wirkt antioxidativ und schützt das Gewebe vor freien Radikalen.

Es reagiert mit Radikalen zu Ascorbylradikal und dann weiter zu Dehydroascorbat. Auf diese Weise werden die freien Radikale unschädlich gemacht.

Vitamin C wirkt auch als Co-Antioxidans, in dem es α -Tocopheroxyl wieder zu α -Tocopherol (Vitamin E) regeneriert.

2.5.2 α -Tocopherol (Vitamin E) im Liquor

α -Tocopherol ist von den fettlöslichen Vitaminen das im Plasma und Liquor am häufigsten vorkommende lipophile Antioxidans. α -Tocopherol wirkt antioxidativ, in dem es durch Wasserstoffabspaltung Lipidperoxidradikale in Lipidhydroperoxide umwandelt und somit die oxidative Kettenreaktion unterbricht. α -Tocopherol geht selber in das weniger reaktive α -Tocopheroxyl über, welches mit einem weiteren Lipidperoxidradikal oder mit einem anderen α -Tocopheroxylradikal zu einem nichtradikalischen Molekül

reagiert. α -Tocopheroxyl kann auch bei Anwesenheit von Ascorbat, wie oben geschildert, wieder zu α -Tocopherol regeneriert werden.

Das α -Tocopheroxyl ist ein Radikal, das unter bestimmten Bedingungen, wenn z.B. keine regenerierende Substanzen wie Ascorbat vorhanden sind, die PUFAS von Lipoproteinen und in den Membranen von Zellen angreifen und den Organismus schädigen (tocopherol-mediated Peroxidation, TMP) (Stocker, 1994). Aus diesem Grund ist die Kombination von Vitamin C und E eine sehr wirkungsvolle Kombination, um den Organismus vor freien Radikalen zu schützen.

2.6 Lipoproteine und Fettsäuren im Liquor

2.6.1 Lipoproteine

Über die Funktion und Zusammensetzung der Lipoproteine im Liquor ist bisher wenig bekannt. Die Struktur und Funktion der Lipoproteine im Liquor sind dem HDL-Partikel des Plasmas sehr ähnlich. Man hat bisher die Apolipoproteine ApoC, D, E, H, J sowie die Apo A-I, A-II und A-IV im Liquor nachweisen können (Borghini et al., 1995). Diese Lipoproteine sind auch im Plasma vorhanden. Während die Apolipoproteine

Apo A-I, A-II und A-IV aus dem Plasma stammen und somit die Blut-Hirnschranke passieren können, werden zumindest die Apolipoproteine ApoE-, D- und J im ZNS synthetisiert und können nicht die Blut-Hirnschranke passieren (Koch et. al., 2000).

Die Funktion der Apolipoproteine besteht hauptsächlich im Transport von Lipiden. Der Lipidstoffwechsel im Gehirn spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Regenerationsfähigkeit des Gewebes. So werden bei den Regenerationsvorgänge vermehrt Apolipoproteine synthetisiert. Zu dem ist Apo-E in der Lage, über das LDL-receptor-related Protein (LRP), das Wachstum der Neuriten zu vermitteln.

Das Apo-E ist das am häufigsten vorkommende Apolipoprotein im Liquor und das ZNS ist nach der Leber, der zweitwichtigste Syntheseort

	Plasma	CSF
Apolipoproteins (mg/dl)		
Apo E	4	0,31
Apo A-I	130 E-10	0,04
Lipids (mg/dl) Total	500	2,3 E-9
Cholesterol	190	0,8 E-9
Phospholipids	200	0,4 E-11
Triglyceride	100	0,4 E-11
Total fatty acids	340	1,0 E-9

Tabelle 7: Concentrations of apolipoproteins and lipids in human CSF compared to plasma (Koch et. al., 2000)

2.6.2 Fettsäuren

Bei den Fettsäuren muß man unterscheiden zwischen gesättigte (nicht essentielle) Fettsäuren und ungesättigte (essentielle) Fettsäuren. Die gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acids, SFA), zu denen Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0) und Arachidinsäure (20:0) gehören, kann der menschliche Organismus selber herstellen. Im Gegensatz dazu können die einfach ungesättigten Fettsäuren (monosaturated fatty acids, MUFA), zu denen Vaccensäure (18:1, n-7) und Ölsäure (18:1, n-9) gehören, vom Körper nicht synthetisiert werden und müssen mit der Nahrung zugeführt werden. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids; PUFA) Linolsäure (18:2, n-6) und Arachidonsäure (20:4, n-6) können aus den MUFAs durch hinzufügen von Doppelbindungen und Modifikationen mit Hilfe körpereigener Enzyme produziert werden.

Tabelle 8: Fatty acids composition of cholesterol esters and triglycerides in CSF and serum of human subjects (From Tichy et. al., 1970).

Fatty acids	Cholesterol-esters		Triglycerides	
	CSF %	S %	CSF %	S %
16:0	23,2	11,0	41,9	24,8
16:1	11,2	3,9	5,2	5,2
18:0	0,6	1,0	14,1	5,1
18:1	37,0	20,9	27,9	36,9
18:2 (n-6)	21,4	53,4	2,8	14,3
18:3 (n-6)	0,2	0,5	0,5	0,3
18:3 (n-3) – 20:1	0,4	1,0	0,7	3,2
20:3 (n-6)	0,3	0,5	0,2	0,6
20:4 (n-6)	4,7	5,2	4,6	3,6
22:6 (n-3)	0,4	0,7	1,7	2,0

2.7 Oxidation von Lipoproteinen

Wie schon erwähnt, können Lipoproteine durch Anwesenheit von Oxidantien (z.B Enzyme, Radikale) oxidativ verändert werden.

Mit Hilfe von Oxidantien wie AAPH (2,2'-azobis-(2-amidinopropane) hydrochloride) können wir Lipoproteine in vitro einem oxidativen Stress aussetzen. Bekannt ist schon seit längerem, dass die Oxidation von LDL Lipoproteine zur pathogenese der Atherosklerosis beitragen.

Im Organismus dienen Antioxidantien wie Ascorbat oder α -Tocopherol der Oxidation von Lipoproteinen entgegen.

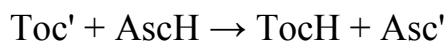
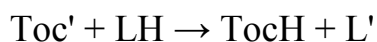
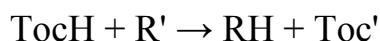
α -Tocopherol ist ein lipophiler Antioxidanz. Unter bestimmten Voraussetzungen, z.B. bei Abwesenheit von Asorbat, entwickelt das α -Tocopherol Eigenschaften eines Pro-Oxidanz. In vitro Studien konnten belegen, dass α -Tocopherol bei Zugabe von hohen Konzentrationen von AAPH (hoher oxidativer Stress) die Oxidation von LDL im Plasma reduziert. Bei jedoch milden Oxidationsbedingungen und Abwesenheit von Ascorbat

zeigt das α -Tocopherol die Eigenschaften eines Pro-Oxidanz (A. Kontush, B. Finckh et al., 1996).

Dieses wird damit begründet, dass im Verlaufe des oxidativen Stress zunehmend das Antioxidanz Ascorbat verbraucht wird, welches zur Regeneration des α -Tocopheroxylradikals in α -Tocopherol benötigt wird. Das α -Tocopheroxylradikal wirkt dann als Pro-Oxidanz und führt zu vermehrten Oxidation von Lipoproteinen. Hier wird auch die Co-Antioxidative Wirkung von Ascorbat (Vitamin C) belegt, in dem es das α -Tocopheroxyl wieder zu α -Tocopherol (Vitamin E) regeneriert.

Es ist zu erwähnen, dass die prooxidative Wirkung von α -Tocopherol nur in vitro belegt werden konnte. In vivo liegen genügend hohe Konzentrationen von Ascorbat in Plasma und Liquor vor, wo das α -Tocopherol seine Hauptwirkung in der antioxidativen Wirkung entfaltet. Man vermutet jedoch, dass auch in vivo bei bestimmten Erkrankungen mit hoher oxidativer Stress wie z.B. bei der Kupferspeicherkrankheit M. Wilson oder der Thalassämia oder auch anderen Hämochromatosen, das α -Tocopherol prooxidativ wirken könnte (Kontush/Finckh et al., 1996). Denn Metalle wie z.B. Eisen, Kupfer, Zink und Quecksilber sind wichtige Katalysatoren bei der Erzeugung freier Radikale.

Die folgenden Darstellungen beschreiben den Mechanismus der antioxidativen und prooxidativen Wirkung von α -Tocopherol sowie die Regeneration von α -Tocopheroxyl zu α -Tocopherol mit Hilfe von Ascorbat.



(TocH = α -Tocopherol; Toc' = α -Tocopheroxylradikal; R' = Radikal; LH= Lipoprotein;
RH = nichtradikalischer Molekül; L' = Lipidperoxidation; AscH= Ascorbat; Asc' = Ascorbatradikal)

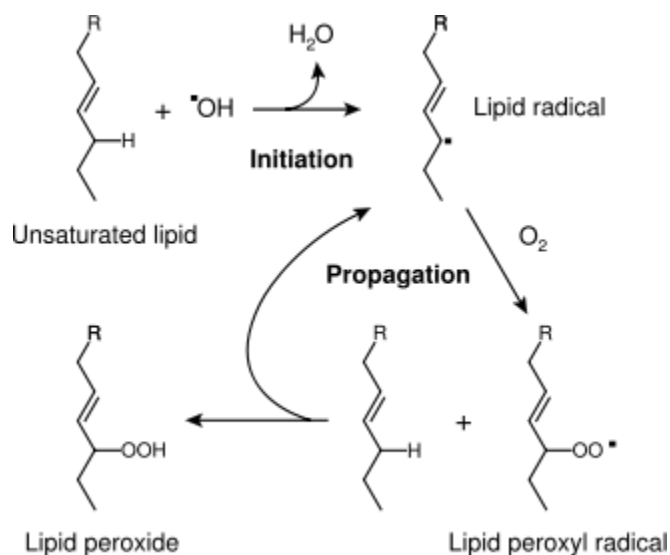
Die Lipoproteinoxidation verläuft in vier Abschnitten: Initiation, Lagphase, Propagationsphase und Plateauphase.

2.7.1 Initiation

Es ist schwer über die Initiation etwas in Erfahrung zu bringen bzw. den Verlauf zu beobachten, da sie eine sehr kurze Zeitspanne beansprucht und auch von den darauf folgenden Phasen überlagert wird.

Die Initiation wird als der erste Schritt in der Lipoproteinoxidation beschrieben. Oxidantien wirken hier als Initiatoren. So können z.B. freie Radikale aus der Umwelt mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) oder Lipoproteine angreifen, ihnen H-Atome (Wasserstoff-Atome) abspalten und so eine Kettenreaktion in Gang setzen, die zur weiteren Abspaltung von H-Atomen und somit auch zur Freisetzung von weiteren Radikalen (z.B. Lipidoxylradikale) führen.

Der Verlauf dieser Oxidation kann aufgrund der entstehenden Lipidmetabolite verfolgt werden.

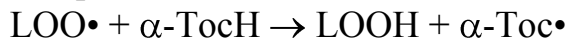


2.7.2 Lagphase

Die Initiation ist nur von kurzer Dauer und anschließend beginnt die sogenannte Lagphase, auch Verzögerungsphase genannt. In dieser Phase kommt es nur zu einem geringen Anstieg der Oxidationsprodukte, da der Organismus verschiedene hydrophile und lipophile Antioxidantien besitzt, die Lipoproteine und PUFAs vor einer Oxidation schützen. Zu solchen Antioxidantien gehören, wie schon einmal erwähnt, z.B. Vitamin C und E. Diese Antioxidantien reagieren entweder direkt mit den freien Radikalen (z.B. Sauerstoffradikale) und machen sie unschädlich oder sie wandeln die aus der

Initiation entstandenen Lipidperoxyradikale ($\text{LOO}\cdot$) in Lipidhydroperoxide (LOOH) um und unterbrechen damit die Kettenreaktion.

Beispiel:



2.7.3 Propagationsphase

Sobald die antioxidativen Substanzen verbraucht sind, geht die Lagphase in die Propagationsphase über. In diesem Abschnitt des Oxidationsverlaufes vermehren sich stark die Lipidperoxid- und Radikalbildung. Da in der Propagationsphase kaum noch oder keine Antioxidantien mehr vorhanden sind, wird die Kettenreaktion der Lipidperoxidation stark beschleunigt, was zu einem ständigen Anstieg der Oxidationsprodukte führt.

2.7.4 Plateauphase

Am Ende der Propagationsphase wird dann ein Punkt erreicht, wo der Zerfall der Peroxide den weiteren Verlauf bestimmt. Es kommt zu keinem weiteren Anstieg der Oxidationsprodukte. Dieser letzte Abschnitt wird als Plateauphase bezeichnet.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

Geräte

- Spektralphotometer UV2 mit Küvettenwechsler für acht Küvetten (PYE-Unicam, Großbritannien)
- Quarzglasküvetten, Volumen 700 µl (Hellma, Deutschland)
- HPLC-System:
 - LKB 2249 HPLC Pump (LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden)
 - LKB 2156 Solvent Conditioner (LKB-Produkte AB, Bromma, Schweden)
 - Elektrochemischer Detektor Coulochem II (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)
 - Analytical Cell Modell 5011 (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)
 - Conditioning Cell Modell 5020 (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)
 - HPLC-Säule LiChrocart 125-4, LiChrospher 100 RP-18, 5 µm Partikelgröße (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Gaschromatographisches System:
 - Gaschromatograph Hewlett-Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)
 - Gaschromatographische Säule HP-5MS, 30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke
- Laborzentrifuge Biofuge A (Heraeus, Deutschland)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Deutschland)
- Laborzentrifuge Labofuge Heraeus Christ (Heraeus, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

- Chelex 100 resin (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA)
- PBS-Dulbecco (Life-Technologies, USA)
- Natriummethoxid (Alltech, Unterhaching, Deutschland)

- 2,2'-azobis- (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH, Polysciences, Inc., Warrington, USA)
- 9 ml EDTA-Monovettensysteme (Sarstedt, Deutschland)
- Lithiumperchlorat (Fluka, Buchs, Schweiz)
- N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) mit 1% Trimethylchlorsilan (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- 5 α -Cholestan und Heptadecansäuremethylester (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Dimethylformamid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Citrat-Acetat-Puffer (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Metaphosphorsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2,6-Dichlorphenolindophenol (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Butylhydroxytoluol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

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

3.2 Messung der Oxidationskinetik mit dem Photometer

Die Oxidierbarkeit des Liquors wird mit Hilfe des Photometers bestimmt. Bei der Oxidation von Lipiden entstehen Hydroperoxide. Deren konjugierte Diene werden durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm gemessen, und erlauben so einen Rückschluß auf die Oxidierbarkeit der Lipoproteine des Liquors.

Die bei minus 80°C gefrorenen Liquorproben werden kurz vor der Oxidation aufgetaut. Der Liquor wird mit PBS verdünnt. PBS (Phosphate-buffered-saline) wird zuvor für eine Stunde mit Chelex behandelt, um Übergangsmetallionen, die die Oxidation beeinflussen könnten, zu entfernen.

Es werden pro Probe drei Ansätze pipettiert:

Zu jeweils 100 μl Liquorprobe werden einmal 100 μl 2,2'-Azobis-(2-Amidinopropan) Hydrochlorid (AAPH, 1mM) als Oxidanz und einmal 100 μl EDTA (10mM) als Antioxidanz hinzugegeben. Beide Proben werden mit jeweils 800 μl PBS verdünnt. Als Autooxidation wird 100 μl Liquorprobe mit 900 μl PBS verdünnt.

Die vorbereiteten Proben werden in Quarzküvetten überführt, mit Nescofilm luftdicht verschlossen und in den auf 37°C temperierten Wechsler des Photometers eingestellt. Die Messungen erfolgen in 5 Minutenintervallen über 24 Stunden.

3.3 Vitamin C-Messung mit dem Photometer

Um die Konzentration von Vitamin C in den Liquorproben zu bestimmen, wird die Vitamin C abhängige Reduktion des Farbstoffs 2,6-Dichlorphenolindo-phenol (DCIP) bei einer Absorption von 520 nm und einem pH-Wert von 3-4,5 gemessen.

Ein Aliquot der Probe, entsprechend 300 μl unverdünntem Liquor, wird mit 300 μl 10%iger Metaphosphorsäure (MPS) und 300 μl 5%iger MPS verdünnt und bei 13000 rpm 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. 400 μl Überstand wird abpipettiert und mit 200 μl Citrat-Acetat-Puffer (CAP) sowie 200 μl DCIP gemischt. 30 Sekunden nach Zugabe des Farbstoffs wird die Absorption bei 520 nm bestimmt. Nach dieser Messung der Probe gibt man einige Kristalle Ascorbinsäure hinzu (bis das DCIP vollständig reduziert = farblos ist) und mißt dann erneut.

3.4 Vitamin E-Messung mit dem HPLC

Die Bestimmung von α - und γ -Tocopherol im Liquor wird mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography durchgeführt. Die lipidlöslichen Bestandteile der Proben werden bei der reversed-phase-HPLC mit elektrochemischer Detektion (ECD) unter hohem Druck getrennt. Die Konzentration der jeweiligen Antioxidantien wird mit Hilfe spezieller Software ermittelt (EZChrom, Pharmacia, Schweden). Als interner Standard wird δ -Tocopherol verwendet.

150 μl der Probe wird mit 150 μl Ethanol und 750 μl Hexan versetzt und eine Minute lang mit einem Vortex-Mixer durchgemischt. Anschließend wird die Mischung 3 Minuten lang bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert, dann 600 μl aus der oberen Hexanphase abpipettiert und unter Stickstoff oder einer Vacuum-Zentrifuge abgedampft. Der Niederschlag wird in 150 μl Ethanol

aufgenommen und mit einem Laufmittelgemisch, bestehend aus Methanol, Ethanol und 2-Propanol im Verhältnis von 18:5:2 und einer 13,5 nM Lithiumperchlorat, mit der reversed-phase-HPLC analysiert.

3.5 Messung der Fettsäuren und Cholesterin mit dem GC-FID

Die Fettsäuren werden mittels der Gas Chromatographie mit Flame Ionisation Detection (GC-FID) unter hohen Temperaturen (250-300°C) gemessen.

Die Konzentration der Fettsäuren und Cholesterin werden mit Hilfe spezieller Software HP ChemStation ermittelt.

3.5.1 Basische Methylierung

Diese Derivatisierungsmethode wird für die Bestimmung der Fettsäuren und des Cholesterins im Liquor durchgeführt und besteht aus den drei Stufen Extraktion, Veresterung und Silylierung.

Extraktion

Die Extraktion der Lipide wird nach Folch vorgenommen (Folch et al., 1957). Dazu werden 100 µl Standards, bestehend aus 5-alpha-Cholestanlösung und Heptadekansäure (17:0) zur Berechnung von Fettsäuren und Cholesterin, sowie T-Butylhydroxytoluene (BHT 0,2 M in Ethanol) als Antioxidans in Eppendorftubes vorgelegt und 300 µl unverdünnter Liquorprobe hinzugefügt. Der Ansatz wird mit 1200 µl Folch (ein Gemisch aus Chloroform : Ethanol 2:1 v/v) versetzt und die Gesamtmischung wird 1 min auf einem Vortxrührer gut durchgemischt, so daß die Lipide in die organische Phase übergehen. Zur Phasentrennung wird der Ansatz anschließend 10 min mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die untere Phase wird abpipettiert und das Lösungsmittel unter Stickstoff verdampft.

Veresterung

Der Rückstand wird in 250 µl Toluol aufgenommen und mit 500 µl einer 0,5 M Lösung von Natriummethoxid 15 min bei 50°C unter Stickstoff inkubiert.

Danach wird die stark alkalische Lösung durch Zugabe von 1 ml 2,5%iger Essigsäure neutralisiert und mit 250 µl Hexan extrahiert. Anschließend wird

die Probe wieder für 1 min auf dem Vortex gemischt, 10 min bei 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Hexanphase wird unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.

Silylierung

Zur Silylierung wird der Rückstand in 100 µl Dimethylformamid (DMFA) aufgenommen und mit 100 µl des Silylierungsreagenz N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid versetzt. Die Probe wird anschließend unter Stickstoff eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Reaktionslösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 20 µl Toluol aufgenommen.

Zur Quantifizierung der Lipide werden 2 µl dieser Lösung in den Gaschromatographen eingespritzt. Als mobile Phase wird Helium mit einer Flußgeschwindigkeit von 1,2 ml/min bei einem Anfangsdruck von 140 kPa verwendet. Die Messung erfolgt über eine HP-5MS-Säule von 30 m Länge mit einer Temperatur des Einspritzblockes von 250°C und einer Detektortemperatur des FID von 300°C. Die Temperatur der Säule wird nach Einspritzen der Probe zunächst 2 min lang auf 170°C gehalten, dann mit einem Anstieg von 4°C/min auf 220°C erhöht, wo sie zunächst 4 min lang konstant gehalten und dann mit einem Anstieg von 15°C/min auf 280°C erhöht wird.

Der Gehalt an gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acids, SFA) wird als die Summe aus Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0) und Arachidinsäure (20:0) berechnet. Die einfach ungesättigten Fettsäuren (monosaturated fatty acids, MUFA) sind Vaccensäure (18:1, n-7) und Ölsäure (18:1, n-9). Und schließlich wird die Summe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) aus Linolsäure (18:2, n-6) und Arachidonsäure (20:4, n-6) berechnet.

3.6 Charakterisierung der Patienten

Die Rekrutierung des gesamten Patienten-Kollektivs erfolgte in der neurologischen und der psychiatrischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf. Ärzte der Gedächtnissprechstunde der psychiatrischen Klinik des Hauses stellten die Diagnose AD nach den gängigen NINCDS-ADRDS bzw. DSM IV-Kriterien fest.

Die Patienten der anderen dementiellen Erkrankungen (M. Parkinson, vasculäre Demenzen und Lew Body Disease) wurden von erfahrenen

Neurologen untersucht und hinsichtlich der Klinik, der Ausprägung und Dauer der Krankheit beurteilt.

In der vorliegenden Arbeit wurden von mir ausschließlich die beiden Patienten-Kollektive untersucht. Um einen Vergleich der Ergebnisse mit Kontrollen zu erhalten, stammen die Ergebnisse von Vitamin C und E sowie die der Fettsäuren und Cholesterin der Kontroll-Probanden aus dem Daten-Archiv der psychiatrischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf. Einen Vergleich der Ergebnisse der Oxidationskinetik der beiden Patienten-Kollektive mit denen der Kontrollen ist leider nicht möglich, da die Messung der Oxidationskinetik sehr sensibel ist und die Kontrollen schon zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt untersucht wurden. Die Kontroll-Probanden wurden damals auf den neurologischen und internistischen Stationen rekrutiert. Ein wichtiges Ausschlusskriterium für die Kontroll-Probanden war ein MMSE-Wert von kleiner als 24. Bei Werten von unter 24 von 30 Punkten besteht ein starker Demenzverdacht.

Für die beiden Patienten-Kollektive wurden Einverständniserklärungen eingeholt und beide Gruppen wurden über die Studienhintergründe und Teilnahmebedingungen aufgeklärt. In einem Fragebogen und aus den Krankenakten wurden Daten wie Alter, Geschlecht, Gewicht sowie die aktuelle Medikation, Begleiterkrankungen wie KHK, Hypertonie und Diabetes mellitus festgehalten. Die persönlichen Daten wurden vertraulich behandelt.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Hamburg genehmigt.

Dem Patientenkollektiv wurden durch eine Lumbalpunktion Liquor entnommen. Sofort im Anschluss an die Liquorentnahme wurde der Liquor in Eppendorf Aliquots portioniert, mit Stickstoff oder Argon begast und bei -80 Grad Celsius eingefroren.

Es wurden Liquorproben von 36 Alzheimer-Patienten sowie von 7 Patienten mit anderen neurologischen bzw. dementiellen Erkrankungen untersucht.

Unter den anderen neurologischen Erkrankungen waren 4 vasculäre Demenzen, 2 Lew Body Demenzen und 1 Parkinson-Demenz.

Bei den Patienten mit Alzheimer waren 29 weibliche und 7 männliche Patienten und unter den Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen waren 3 Frauen und 4 Männer vertreten. Bei den Kontrollen waren 12 weibliche und 6 männliche Vertreter.

Das Durchschnittsalter der Alzheimer-Patienten betrug 70 ± 9 Jahren, die der anderen Demenzen 72 ± 7 Jahren und die der Kontrollen 49 ± 15 .

Die Patienten mit Alzheimer erreichten einen mittleren Score in der Mini Mental Examination (MMSE) von 18 ± 6 . Bei diesem Test erreichten die Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen einen etwas besseren Mittelwert von 22 ± 5 . Mit einem Mittelwert von 28 ± 2 haben die Kontrollen am besten abgeschnitten (Tabelle 9).

	AD n=36	Andere Demenzen n=7	Kontrollen n=18
Alter	70 ± 9	72 ± 7	49 ± 15
Geschlecht (W/M)	29/7	3/4	12/6
MMSE-Score	18 ± 6	22 ± 5	28 ± 2

Tabelle 9: zeigt einige Basisdaten der Patientenkollektive

3.7 Statistische Programme und Testverfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistika Programms SPSS. Mit Hilfe des t-Testes für unabhängige Stichproben wurden die gemessenen Parameter bei Patienten und Kontrollen in Bezug auf ihren Mittelwert, der Standardabweichung und ihrem p-Wert für die statistische Signifikanz analysiert und miteinander verglichen.

Die Signifikanz beschreibt die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses. Der p-Wert ist signifikant, wenn $p < 0,05$ ist (5% Fehlerwahrscheinlichkeit). Je niedriger der p-Wert ist, desto verlässlicher ist die beobachtete Beziehung der Variablen zueinander.

4 Ergebnisse

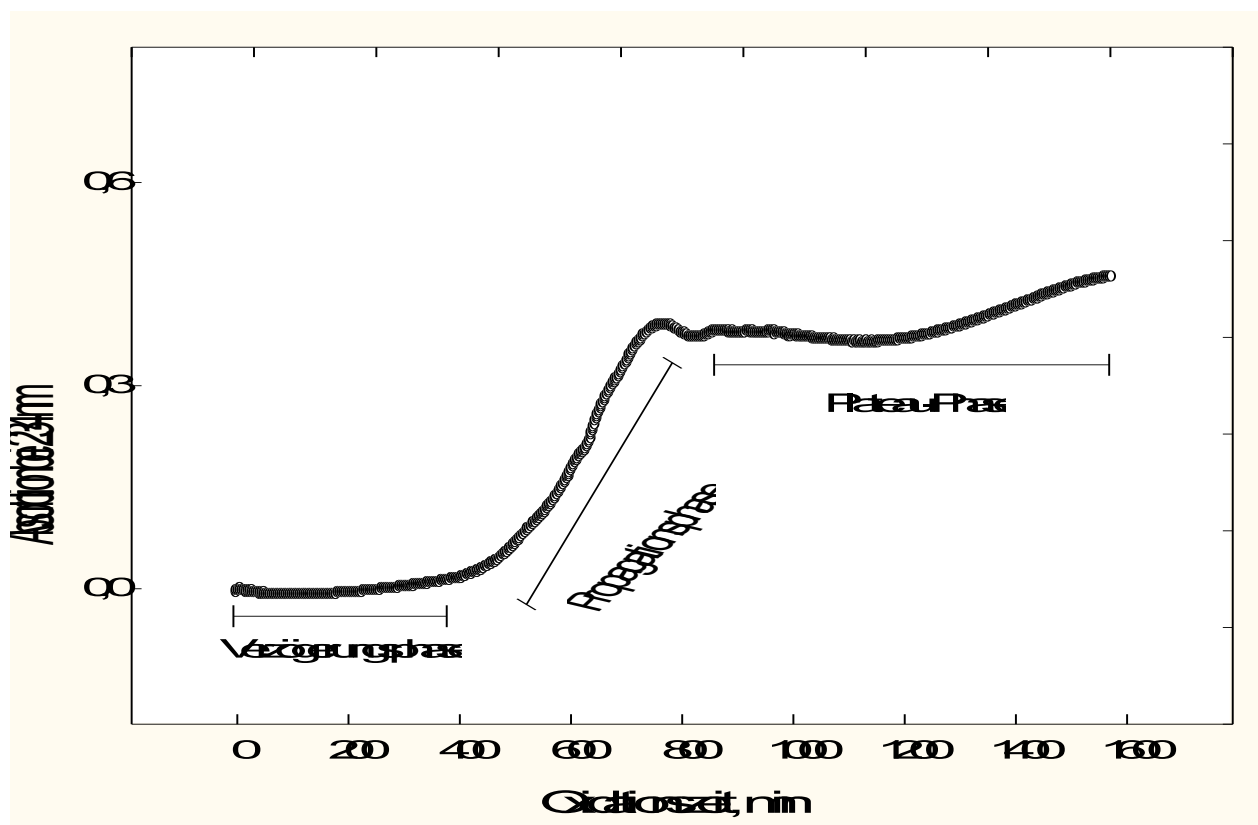
4.1 Oxidationskinetik

Um die Oxidationskinetik bzw. die Konzentration von Antioxidantien im Liquor zu bestimmen, werden die Liquorproben verschiedene Meßmethoden unterworfen. Zu diesen Methoden gehören die photometrische Messung der Lipoproteinoxidation, die Vitamin C- Messung mit dem Photometer und Vitamin E- Messung mit dem HPLC-Gerät, sowie die Fettsäurenbestimmung mit dem Gaschromatographen.

4.2 Lipoproteinoxidation im Liquor

Die Absorbionsmessung der Lipoproteinoxidierbarkeit im Liquor erfolgt bei einer Wellenlänge von 234 nm. Die Kinetik der Lipoproteinoxidation zeigt (wie schon erwähnt) drei aufeinanderfolgende Phasen, die Lagphase, die Propagationsphase und die Plateauphase (Abb. 1). In der Lagphase ist die Oxidationsrate (gemessen in nM Diene/l/min) nahe Null, in der Propagationsphase erreicht sie ihr Maximum und in der Plateauphase nimmt sie wieder stark ab.

Abb. 1: Die drei Phasen der Lipoproteinoxidation bei der kontinuierlichen Absorbionsmessung bei 234 nm.



Auf den Abbildungen 2 und 3 sind die Oxidationsgeschwindigkeiten bei Abwesenheit von exogenen Oxidantien beider Patientenkollektive sowie Kontrollen dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die Liquoroxidation von Alzheimer-Patienten sowohl in der Lagphase als auch in der Propagationsphase eine höhere Oxidationsrate hat als die der Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen. Vor allem ist der Unterschied in der Lagphase sehr deutlich zu erkennen. Bei Zusatz von exogenen Oxidantien (z.B. AAPH) wird die Oxidationsrate stark beschleunigt (Abbildung 4).

Die Dauer der Lagphase bei der Liquoroxidation ist abhängig vom Gehalt an oxidierbaren Substraten, dem Gehalt an Oxidantien und von der Konzentration an Antioxidantien, vor allem Ascorbat, im Liquor. So bald die Antioxidantien verbraucht werden, nimmt die Oxidationrate stark zu und die Lagphase geht in die Propagationsphase über.

Je höher die Konzentration der im Liquor vorhandenen Antioxidantien ist, desto länger ist die Dauer der Lagphase.

Während die Dauer der Lagphase bei beiden Patientenkollektiven fast identisch ist, ist dagegen die Propagationsphase bei den Alzheimer-Patienten deutlich kürzer als bei den Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen (Abb. 3 und 5).

Da die Ergebnisse *in vitro* gemessen wurden, könnte dieses zu der Schlußfolgerung führen, daß Alzheimer-Patienten unter einer größeren oxidativen Stress stehen als Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen.

Abb. 2

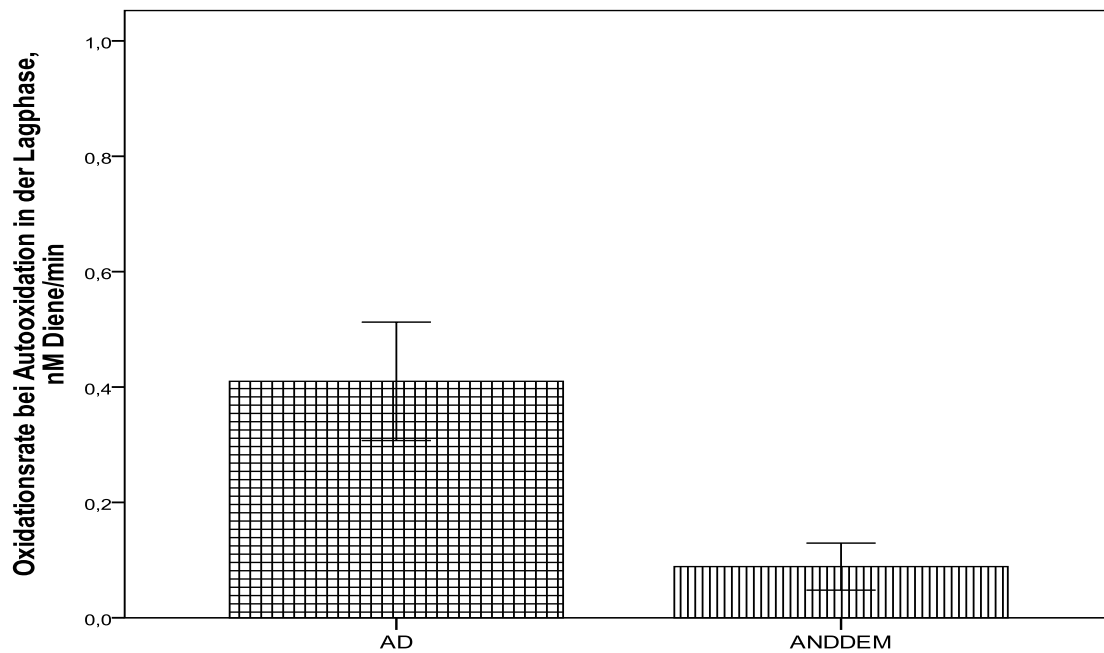


Abb. 2 : zeigt die Oxidationsraten in der Lagphase bei Autooxidation der Liquores der beiden Patientenkollektive. Der Liquor wurde 10-fach verdünnt und für ca 33 Stunden bei 37° C ohne Zusatz von exogenen Oxidantien inkubiert. Balken stellen Mittelwerte + Standardabweichungen dar.

Abb. 3

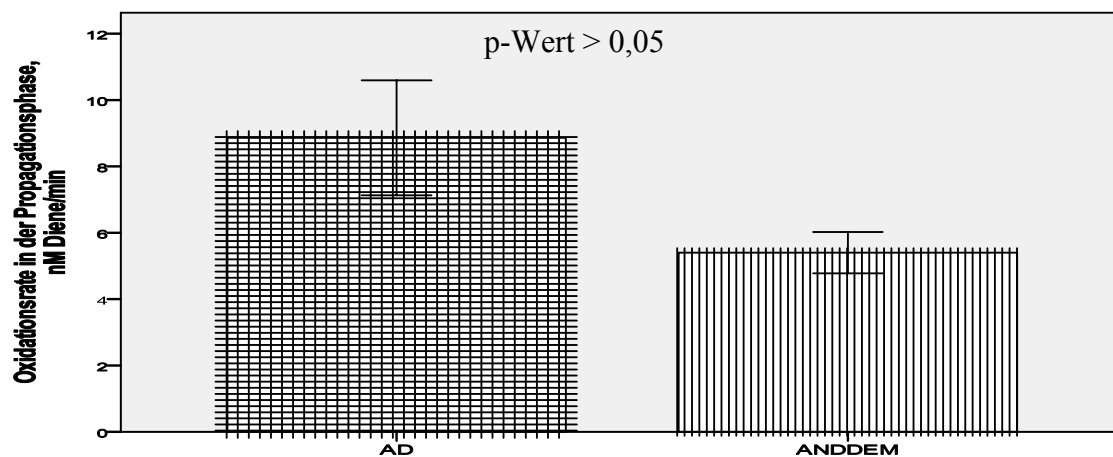


Abb. 3 : zeigt die Oxidationsraten in der Propagationsphase bei Autooxidation der Liquores der beiden Patientenkollektive. Der Liquor wurde 10-fach verdünnt und für ca 33 Stunden bei 37° C ohne Zusatz von exogenen Oxidantien inkubiert. Balken stellen Mittelwerte + Standardabweichungen dar.

Abb. 4

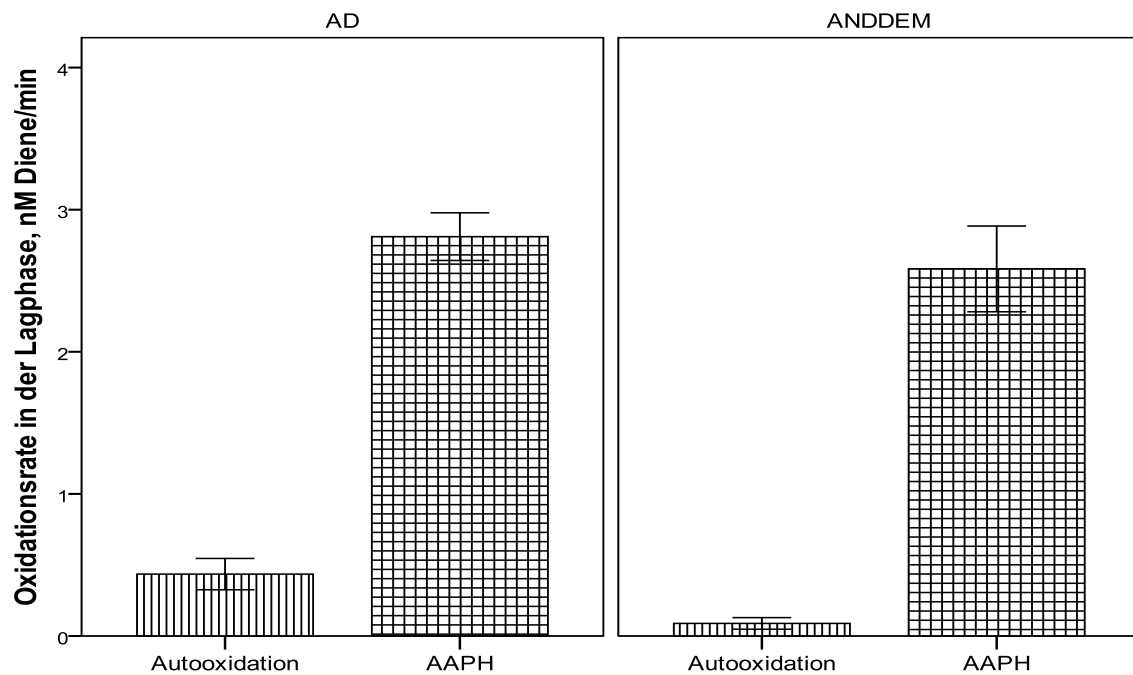


Abb. 4: Dargestellt ist die Oxidationsrate in der Lagphase der beiden Patientenkollektive. Die Liquores wurden 10-fach verdünnt und bei 37° C für mindestens 33 Stunden ohne Zusatz von exogenen Oxidantien (Autooxidation) und bei Anwesenheit von exogenen Oxidantien (AAPH) inkubiert. Balken stellen Mittelwerte + Standardabweichungen dar.

Abb. 5

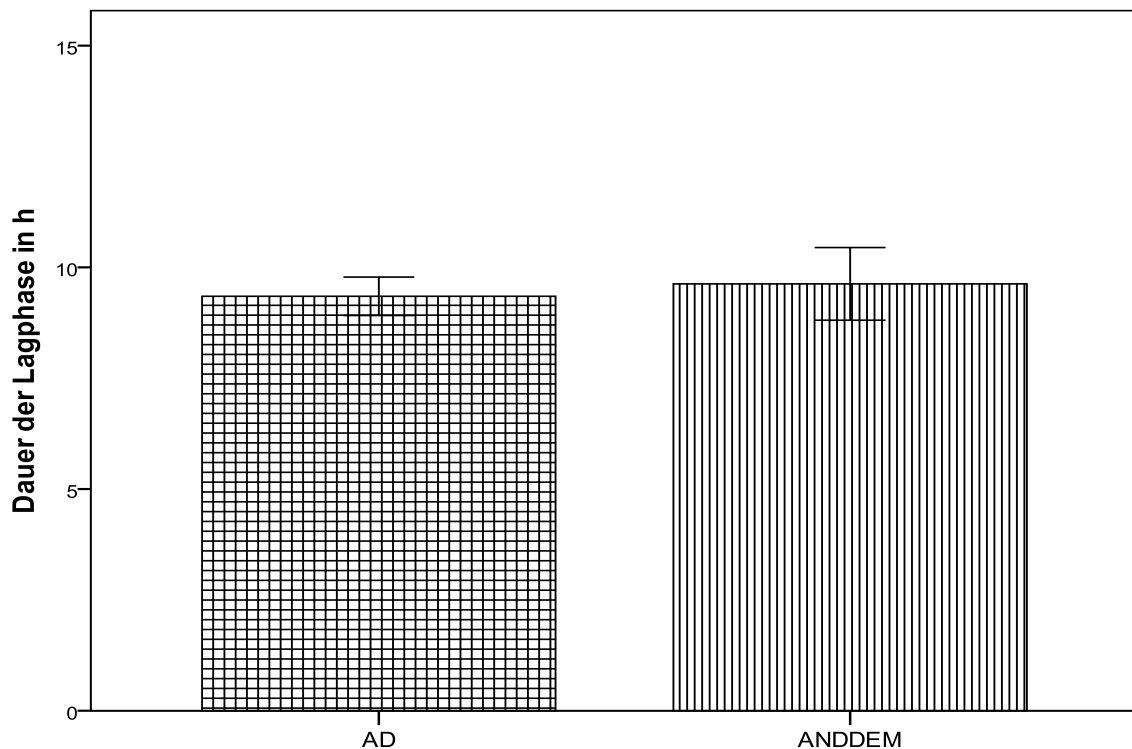


Abb. 5: zeigt die Dauer der Lagphase beider Patientenkollektive. Der Liquor wurde 10-fach verdünnt und bei Abwesenheit von exogenen Oxidantien bei 37° C für mindestens 33 Stunden inkubiert. Der Balken stellt Mittelwert + Standardabweichung dar.

	Autoox./Lagphase	AAPH	Dauer/Lagphase
AD/ANDDEM	p<0,01	p>0,05	p>0,05

4.3 Vitamin C- und E- Konzentration im Liquor

Ascorbat und α -Tocopherol stellen die wichtigsten Antioxidantien im Liquor dar. Ascorbat ist das häufigste hydrophile Antioxidanz im menschlichen Organismus. Von den lipophilen Antioxidantien im Liquor ist α -Tocopherol am häufigsten vorhanden. Im allgemeinen liegen die Konzentrationen von Antioxidantien beim Menschen im Plasma höher als im Liquor. Nur Ascorbat erreicht im Liquor eine deutlich höhere Konzentration als im Plasma.

Es wurden die Konzentrationen von Ascorbat und α -Tocopherol im Liquor von Patienten mit Alzheimer und anderen dementiellen Erkrankungen gemessen.

Die Tabelle 9 und die Abbildungen 6 und 7 zeigen, dass der Gehalt an Ascorbat im Liquor von Alzheimer-Patienten etwas höher ist (129,72 μ M) als bei Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen (120,12 μ M).

Der α -Toc-Gehalt im Liquor von Alzheimer-Patienten ist nur geringfügig niedriger als bei Patienten mit anderen Demenzen (25,57 nM vs. 27,16 nM). Bei beiden Patientenkollektive liegen die Konzentrationen von Ascorbat und α -Tocopherol deutlich unter dem Durchschnitt der gesunden Bevölkerung. Bei Ascorbat als Hauptantioxidans im Liquor ist der Unterschied noch deutlicher.

Tab. 9 Ascorbat und α -Toc im Liquor

	AD		ANDDEM		Kontrollen	
	Mittelwert	n	Mittelwert	n	Mittelwert	n
Ascorbat (μ M)	129,72 \pm 52,76	36	120,12 \pm 20,04	7	210,14 \pm 37,71	18
α -Toc (nM)	25,57 \pm 11,63	36	27,16 \pm 4,67	7	54,72 \pm 27,20	18

	Ascorbat	α -Toc
AD/ANDDEM	p>0,05	p>0,05
AD/KONTR.	p<0,01	p<0,01
ANDDEM/KONTR.	p<0,01	p<0,01

Abb. 6

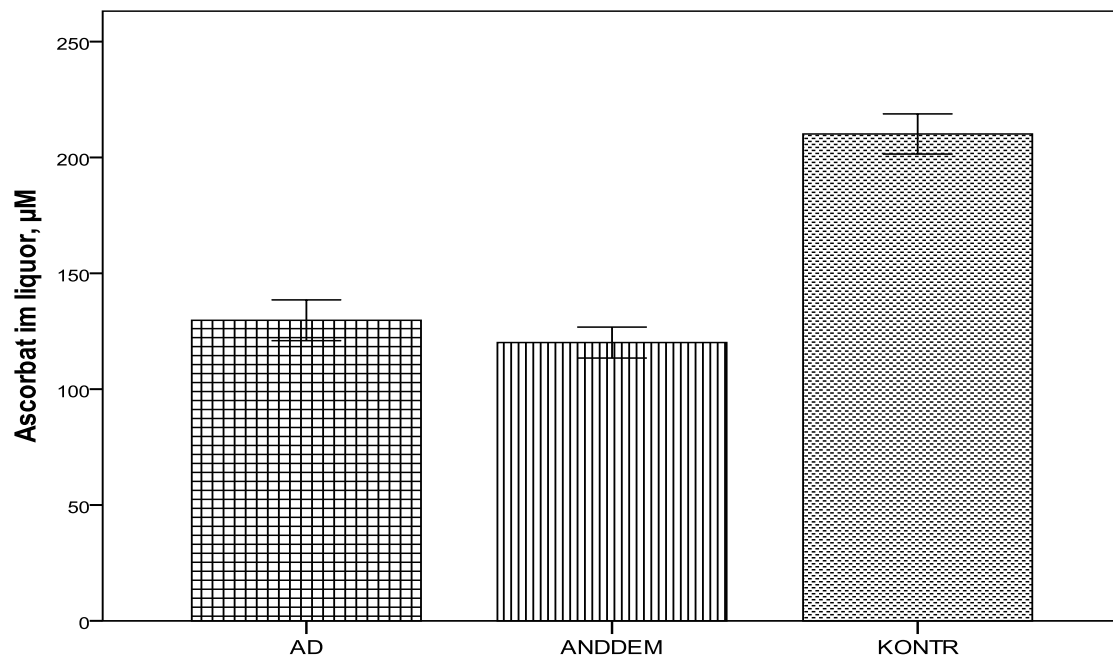


Abb. 7

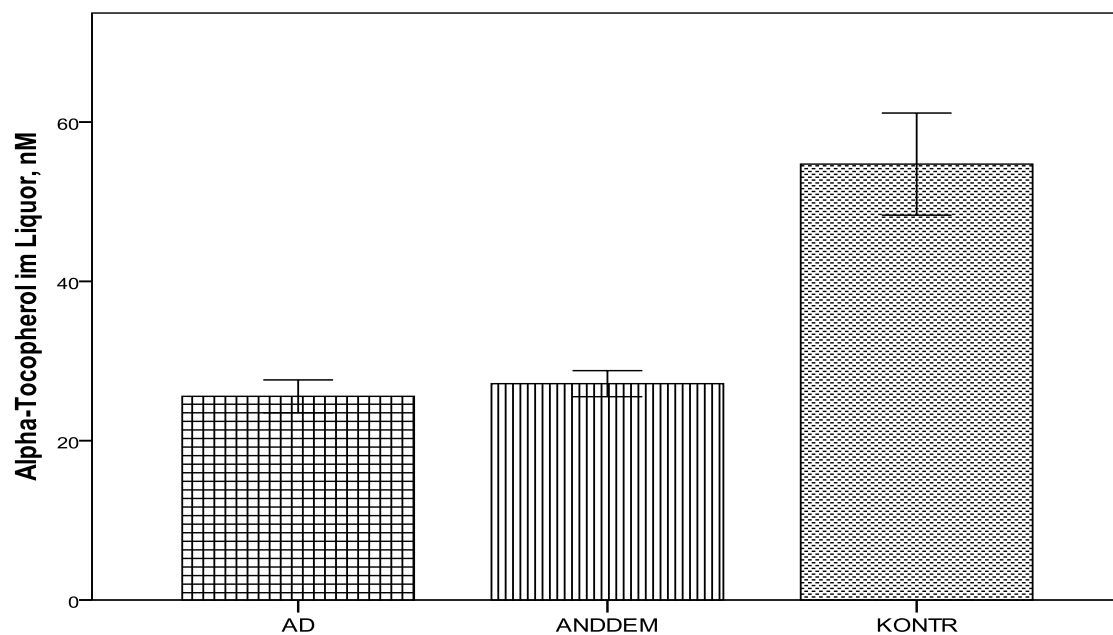


Abb. 6 und 7: Dargestellt sind die Konzentrationen von Ascorbat und α -Tocopherol im Liquor beider Patientenkollektive. Der Liquor wurde 10-fach verdünnt und bei 37° C ohne Zusatz von exogenen Oxidantien für ca. 33 Stunden inkubiert. Der Balken stellt Mittelwert + Standardabweichung dar.

4.4 Cholesterin und Fettsäuren im Liquor

Auch das Fettsäuremuster des Liquors wurde bestimmt, um festzustellen, ob sich ein Unterschied zwischen Patienten mit Alzheimer oder anderen dementiellen Erkrankungen aufweist. Vor allem die mehrfach ungesättigten-Fettsäuren (z.B. Linol- und Arachidonsäure) sind sehr anfällig bei der Liquoroxidation.

Tabelle 10 zeigt den Fettsäuremuster und den Cholesteringehalt des Liquores des gesamten Patientenkollektivs im Vergleich zu den Kontrollen.

	AD		ANDDEM		Kontrollen	
	Mittelwert	n	Mittelwert	n	Mittelwert	n
Cholesterin (mg/l)	4,98 ± 1,52	36	5,76 ± 0,87	7	5,66 ± 1,94	18
SFA (mg/l)	4,29 ± 1,59	36	5,95 ± 0,96	7	12,94 ± 26,22	18
MUFA (mg/l)	3,45 ± 1,36	36	4,34 ± 1,18	7	5,84 ± 3,78	18
PUFA (mg/l)	1,10 ± 0,55	36	1,63 ± 0,29	7	2,45 ± 1,34	18
TFA (mg/l)	8,83 ± 2,55	36	12,10 ± 1,87	7	21,23 ± 29,19	18
SFA %	48,16 ± 6,99	36	49,24 ± 2,53	7	50,24 ± 10,14	18
MUFA %	39,48 ± 9,76	36	36,79 ± 6,38	7	34,20 ± 7,05	18
PUFA %	12,36 ± 4,69	36	13,97 ± 4,69	7	15,56 ± 4,64	18

Tab. 10 Cholesterin und Fettsäuren im Liquor. Mittelwert + Standardabweichung.

	Cholesterin	SFA	MUFA	PUFA	TFA
AD/ANDDEM	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05
AD/KONTR	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,01	p>0,05
ANDDEM/KONTR	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05

	SFA%	MUFA%	PUFA%
AD/ANDDEM	p>0,05	p>0,05	p>0,05
AD/KONTR	p>0,05	p>0,05	p<0,05
ANDDEM/KONTR	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Abb. 8

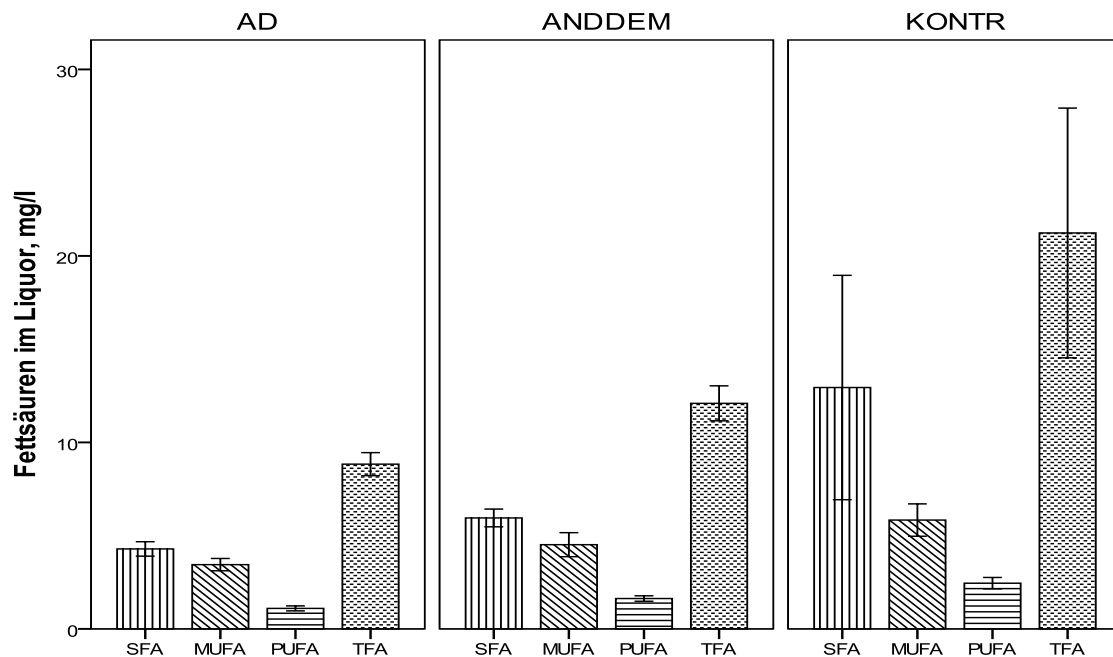


Abb. 8: Dargestellt sind die gesättigten Fettsäuren (saturated fatty acids, SFA), die einfach- ungesättigten FS (monounsaturated fatty acids, MUFA), die mehrfachungesättigten FS (polyunsaturated fatty acids, PUFA) und die Gesamtfettsäuren (total fatty acids, TFA) im Liquor beider Patientenkollektive.

Das Fettsäuremuster zeigt einen niedrigeren Gehalt an Gesamtfettsäuren beim Alzheimerkollektiv (8,82 mg/l vs. 10,3 mg/l) im Vergleich zu anderen Demenz-Patienten. In der Gruppe der einfachungesättigten Fettsäuren liegt der Gehalt mit 3,29 mg/l beim Alzheimerkollektiv gegenüber 4,21 mg/l bei den anderen Demenzen ebenfalls niedriger (in Prozent der Gesamtfettsäuren: 38,1% vs. 41,09%). Im Gegensatz zu den obengenannten Fettsäuregruppen liegt der Prozentuale Gehalt der mehrfachungesättigten Fettsäuren beim Alzheimerkollektiv mit 13,28% gegenüber 12,02% höher als bei Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen. Der Prozentuale Gehalt an gesättigten Fettsäuren ist annähernd gleich (46,63% vs. 46,88%).

In Abbildung 9 ist der Prozentuale Anteil der einzelnen Fettsäuregruppen bezogen auf die Gesamtfettsäuren dargestellt.

Abb. 9

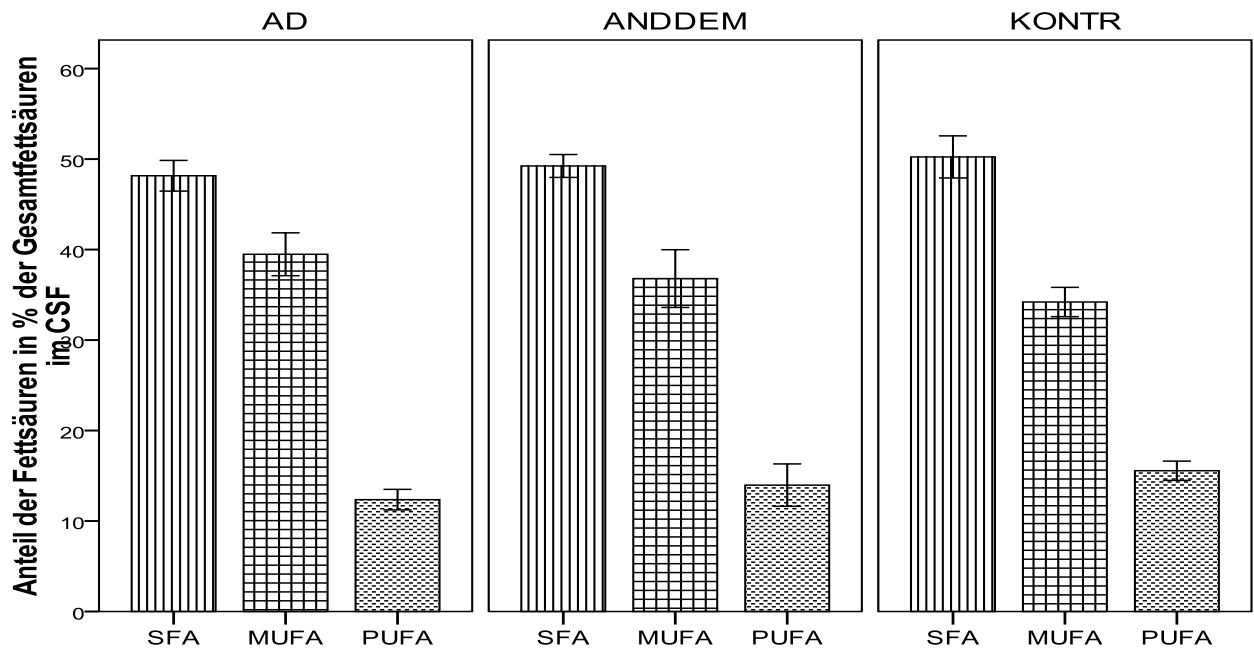


Abb. 9: Dargestellt sind Anteile der gesättigten FS (SFA), der einfach ungesättigten FS (MUFA) und der mehrfach ungesättigten FS (PUFA) in % der Gesamtfettsäuren im Liquor beider Patientenkollektive.

Zu den gesättigten FS (SFA) werden Palmitin- (16:0) und Stearinsäure (18:0) gerechnet. Die Summe der einfach ungesättigten FS (MUFA) wird berechnet aus Öl- (18:1, n-9) und Vaccensäure (18:1, n-7). Mehrfach ungesättigte FS (PUFA) sind Linol- (18:2, n-6) und Arachidonsäure (20:4, n-6).

Abb. 10

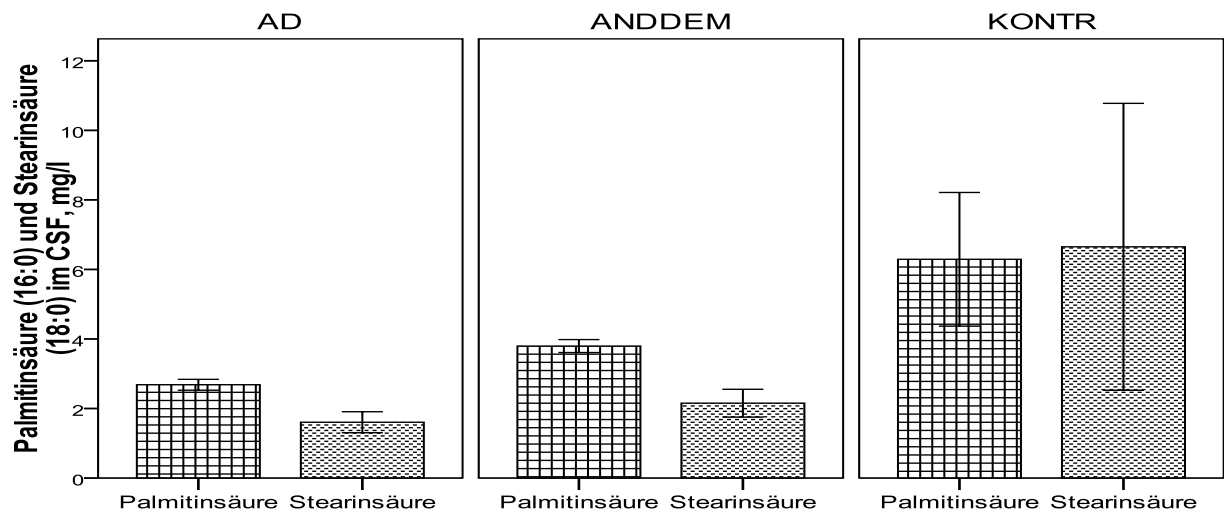


Abb. 11

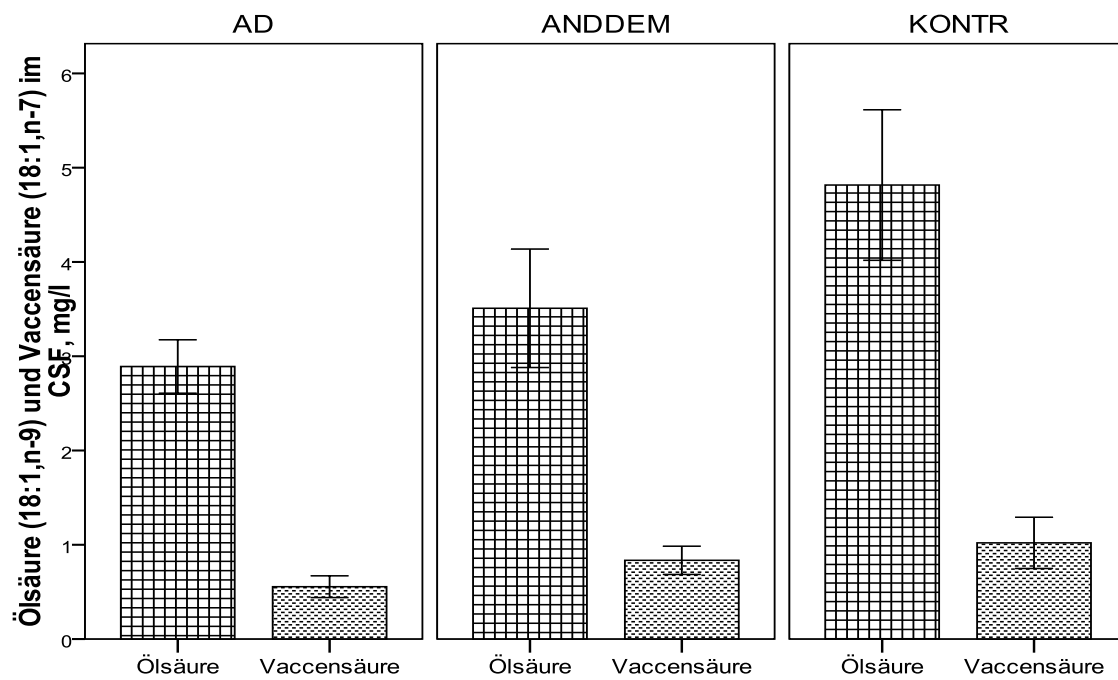


Abb. 12

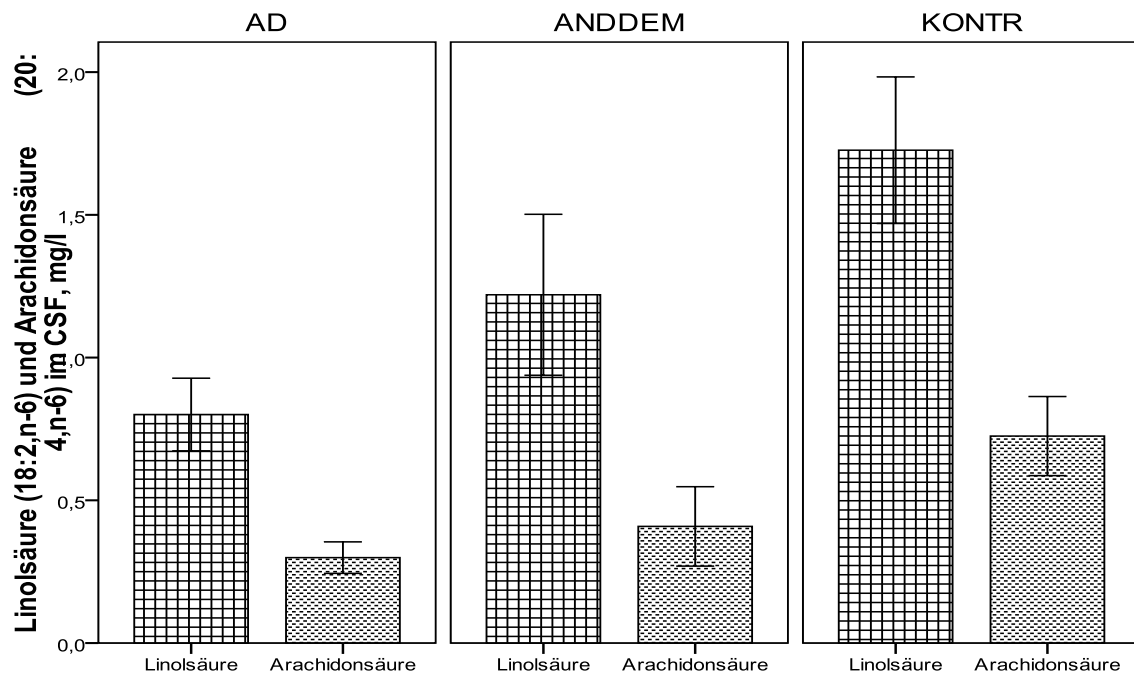


Abb. 10, 11 und 12: Dargestellt sind die einzelnen FS Palmitin- und Stearinsäure, Öl- und Vaccensäure sowie Linol- und Arachidonsäure im Liquor beider Patientenkollektive. Der Balken stellt Mittelwert +/- Standardabweichung dar.

	Palmitinsäure	Stearinsäure
AD/ANDDEM	p<0,05	p>0,05
AD/KONTR	p>0,05	p>0,05
ANDDEM/KONTR	p>0,05	p>0,05

	Ölsäure	Vaccensäure
AD/ANDDEM	p>0,05	p>0,05
AD/KONTR	p<0,05	p>0,05
ANDDEM/KONTR	p>0,05	p>0,05

	Linolsäure	Arachidonsäure
AD/ANDDEM	p>0,05	p>0,05
AD/KONTR	p<0,05	p<0,05
ANDDEM/KONTR	p>0,05	p>0,05

Betrachtet man die einzelnen FS genauer, dann zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen und den Kontrollen. Alzheimer-Patienten weisen in allen Gruppen der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren einen niedrigeren Gehalt gegenüber anderer dementiellen Erkrankungen.

Vergleichen wir unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen von gesunden Kontrollen, dann stellen wir bei beiden Patientenkollektive einen niedrigeren Gehalt in allen Gruppen der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren gegenüber gesunden Kontrollen fest.

Lediglich der Liquor-Cholesteringehalt zeigt in allen drei Gruppen untereinander nur wenig Unterschiede auf (Tabelle 10 und Abbildung 13).

Abb. 13

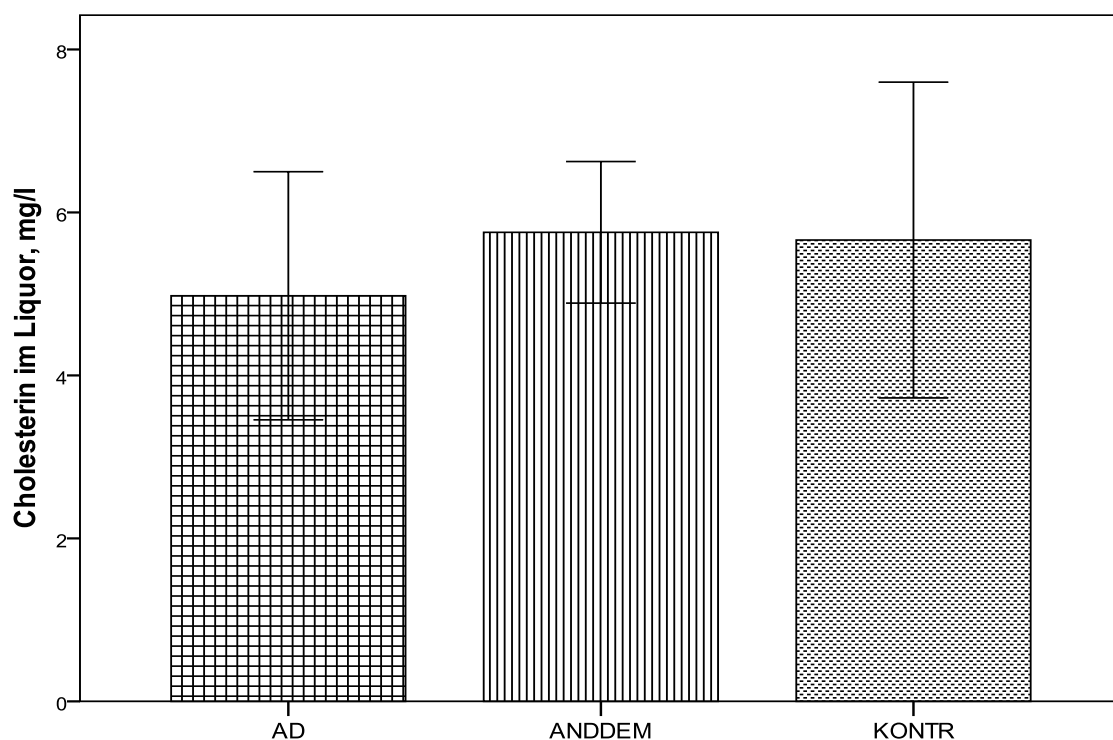


Abb. 13: zeigt den Cholesteringehalt im Liquor beider Patientenkollektive und Kontrollen.

5 Diskussion

Die AD gewinnt durch die Überalterung immer mehr an Bedeutung in der Gesellschaft. Seit Jahrzehnten wird an der Pathomechanismus der AD geforscht. Ihre Entstehung ist sehr komplex und ist immer noch nicht verstanden.

Es werden diverse Hypothesen aufgestellt, um den Pathomechanismus zu erklären. Die Hypothese des Einflusses oxidativen Stresses ist weitestgehend anerkannt und durch viele Arbeiten untermauert.

Untersuchungen an dementen Personen bieten deutliche Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress in Gehirnen von Alzheimer- und anderen neurodegenerativen Patienten, deren Ausmaße von gesunden Personen deutlich überschreiten.

In vergangenen Studien wurden bei Alzheimer-Patienten deutlich niedrigere Konzentrationen von Antioxidantien in Plasma und Liquor gefunden, vor allem α -Tocopherol und Ascorbat. Ein solcher Mangel kann grundsätzlich auf mangelhafter Einnahme, mangelhafter Resorption im Darm und Transport im Organismus oder erhöhtem Verbrauch der Antioxidantien beruhen. Ein erhöhter Verbrauch der Antioxidantien bei Alzheimer-Patienten ist eher wahrscheinlich.

Im Gehirn fallen Oxidationsprodukte an und umgekehrt proportional werden oxidierbare Substrate verbraucht. Bei gesunden Menschen werden diese Oxidationsprozesse durch Regelmechanismen kontrolliert, welche die Oxidation in Grenzen halten. Bei Alzheimer-Patienten funktionieren diese Regelmechanismen nur eingeschränkt. Metalle wie Eisen und Kupfer, die Initiatoren der Oxidation sind, werden im Hirn von Alzheimer-Patienten vermehrt gefunden. Freie Radikale, die aufgrund ihrer Schädlichkeit nur in geringem Maße im gesunden Patienten frei werden und durch antioxidativ wirkende Substanzen oder Enzyme abgefangen werden, werden im Hirn von Alzheimer erkrankten verstärkt gebildet (mitochondrial, β -Amyloid) oder mangelhaft abgewehrt.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise gefunden werden, dass die schon bei Alzheimer bekannte Liquorlipoproteinoxidation wahrscheinlich auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielt.

Der menschliche Liquor cerebrospinalis enthält Lipoproteine, die für den Transport von Lipiden zuständig sind. Es ist mittlerweile erwiesen, dass diese Lipoproteine wie auch die Lipide sowohl im Plasma als auch im Liquor bei Alzheimer-Patienten verstärkt oxidativ modifiziert werden (Arlt et al., 2000; Schippling et al., 2000).

Oxidative Prozesse greifen den Körper an unzähligen Stellen an, und werden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, zum einen mit neurodegenerativen Prozessen wie Alzheimer, Parkinson und normalem Alterungsprozess, wie auch mit Atherosklerose, Emphysem und Diabetes.

Viele Forschergruppen untersuchten die Konzentration von Antioxidantien in Alzheimer-Patienten. Antioxidantien spielen in der Pathogenese der AD eine wichtige Rolle. Werden oxidative Prozesse als Schlüsselmechanismus betrachtet, so werden im gleichen Atemzug antioxidative Substanzen wie Vitamine als schützende Agentien genannt. Alzheimer-Patienten weisen sowohl im Plasma als auch im Liquor verringerte Konzentrationen der meisten Antioxidantien auf (Jiménez-Jiménez et al. 1997; Schippling et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Faktoren im Liquor von Alzheimer-Patienten und Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen gemessen:

die Oxidationskinetik

Vitamin C- und E- Gehalt

sowie der Gehalt an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren.

Mit meinen Ergebnissen konnte ich zeigen, daß bei in vitro Oxidation von Liquores von Alzheimer- und anderen neurodegenerativ erkrankten Patienten eine deutlich erhöhte Akkumulation konjugierter Diene stattfindet.

Auch der Gehalt an Ascorbat und α -Tocopherol sowie der Gehalt an gesättigten und ungesättigten Fettsäuren im Liquor sind bei beiden Patientenkollektive gegenüber Gesunden erniedrigt.

Die Liquoroxidation ist abhängig von der Menge der zur oxidierbaren Substanzen, von der Konzentration der Oxidantien und der Antioxidantien.

Die drei Phasen der Liquoroxidation sind stets gleich: Lagphase, Propagationsphase und Plateauphase.

Da in der Lagphase der Liquoroxidation zunächst genügend Antioxidantien wie Ascorbat oder α -Tocopherol vorhanden sind, findet in dieser Anfangsphase kaum eine Veränderung der Oxidationsrate statt. Nach dem Verbrauch von Ascorbat, welches als das Hauptantioxidanz im menschlichen Organismus angesehen wird, beginnt dann erst der Verbrauch von α -Tocopherol (Arlt et al., 2000). α -Tocopherol ist allerdings alleine nicht mehr in der Lage die Liquorlipoproteine und Fettsäuren vor der Oxidation zu schützen und es kommt zu einer vermehrten Produktion von Lipidhydroperoxiden und so auch zu einem steilen Anstieg der Absorptionskurve bei 234 nm. Dieser Abschnitt ist definiert als die Propagationsphase. Sind kaum noch oxidierende Substrate vorhanden, geht

die Propagationsphase in die Plateauphase über, in der es zu keinem weiteren nennenswerten Anstieg der Oxidationsrate mehr kommt und die Oxidationskurve abflacht. Aus vorhergegangenen Studien (Arlt et al., 2000; Schippling et al., 2000) ist uns bekannt, dass die Liquoroxidationsgeschwindigkeit von Alzheimer-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen wesentlich gesteigert ist. In der vorliegenden Arbeit zeigen Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen im Vergleich zu Alzheimer-Patienten ebenfalls eine gesteigerte Liquoroxidation. So ist bei beiden Patientenkollektiven die Lagphase deutlich beschleunigt. In der Lagphase wird die Oxidation durch Antioxidantien (z.B. Vitamin- C und E) verlangsamt bzw. inhibiert. Das würde bedeuten, daß bei den Patienten mit Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen eine Voroxidation stattgefunden haben müsste. Dies führt zu der Vermutung eines ebenfalls erhöhten oxidativen Stresses bei Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie bei AD.

In meinen Untersuchungen stelle ich bei beiden Patientenkollektive einen erniedrigten Gehalt an Ascorbat und α -Tocopherol im Vergleich gegenüber gesunden Kontrollen bei vorhergegangenen Studien (Arlt et al., 2000; Schippling et al., 2000) fest.

Ascorbat (Vitamin C) ist das wichtigste Antioxidanz im menschlichen Organismus. Es schützt im Organismus effektiv Lipoproteine und Fettsäuren vor oxidative Veränderungen. Vitamin C hat auch die Funktion eines Co-Antioxidanz. Ascorbat besitzt nämlich auch die Fähigkeit α -Tocopheroxyl wieder zu α -Tocopherol zu reduzieren. Die Konzentration von Ascorbat im Liquor liegt 3-5 mal höher als die des Plasmas. Andere hydrophile und lipophile Antioxidantien sind im Liquor wesentlich niedriger konzentriert als im Plasma. Dies deutet auf einen aktiven Transportmechanismus, welcher Ascorbat aktiv von der Blutbahn in den Liquorraum pumpt. Vitamin E (α -Tocopherol) gehört zu dem wichtigsten Vertreter unter den lipophilen Antioxidantien im humanen Liquor cerebrospinalis. α -Tocopherol verhält sich in der Anwesenheit von Vitamin C als Antioxidanz. Allerdings kann α -Tocopherol unter bestimmten Bedingungen, z.B. unter milden oxidativen Bedingungen und in der Abwesenheit von Ascorbat, prooxidativ wirken (Kontush et al., 1996 a). Diesen Vorgang nennt man auch α -tocopherol-mediated-peroxidation (TMP). Nach dem Verbrauch von Ascorbat könnte sich α -Tocopherol prooxidativ verhalten und so vermehrt α -Tocopheroxyradikale produzieren, die die Oxidationsrate noch weiter erhöhen. Dies könnte in vivo durch eine Supplementierung von Vitamin E ohne Zugabe von Vitamin C bei Alzheimer- oder andere neurodegenerativ

erkrankte Patienten sich eventuell negativ auf die oxidativen Bedingungen auswirken.

Wie oben schon erwähnt sind bei beiden Patientenkollektive der Gehalt an Antioxidantien im Liquor erniedrigt. Durch Alzheimer-Studien in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass durch die verstärkte oxidative Bedingungen, die bei Alzheimer-Patienten herrschen, die Konzentrationen der Antioxidantien im Liquor dieser Patienten deutlich niedriger waren als bei gesunden Kontrollen. Dies wiederum legt die Vermutung nahe, dass auch bei den anderen neurodegenerativen Erkrankungen verstärkte oxidative Bedingungen herrschen müssen, die den Verbrauch von Antioxidantien (wie Vitamin C und Vitamin E) erhöhen. Ein gesunder Organismus hat normalerweise genügend Abwehrmechanismen, zu denen die Antioxidantien gehören, um die Radikale, die sowohl aus der Umwelt stammen als auch im Körper selbst produziert werden, abzuwehren. Der niedrigere Gehalt an Antioxidantien im Liquor von Alzheimer- und anderen Demenz-Patienten führt zu der Schlußfolgerung, dass diese Patienten nicht in der Lage sind sich gegenüber den Angriffen der Radikalen effektiv zu schützen. Allgemein gesagt können niedrige Konzentrationen von Antioxidantien im Plasma und Liquor von neurodegenerativ erkrankten Patienten auf erhöhte oxidative Belastung durch Radikale hinweisen. Diese Vermutung wird durch meine Ergebnisse nochmals unterstrichen.

Die Lipoproteine im menschlichen Liquor cerebrospinalis sind den HDL-Partikeln des Plasmas sehr ähnlich (Borghini et al., 1995). Lipoproteine sind für den Transport von Lipiden verantwortlich und üben somit eine wichtige Funktion im Fettsäurestoffwechsel des Organismus aus. Anhand von Studien konnten wir belegen, dass Lipoproteine im Liquor durch in Vitro-Oxidation verändert werden (Arlt et al., 2000). Infolgedessen entstehen Lipidhydroperoxide, die so als Radikale fungieren und eine Kettenreaktion auslösen können. Auf diese Weise können die modifizierten Lipoproteine dem Organismus großen Schaden zufügen.

Fettsäuren sind feste Bestandteile von z.B. Lipoproteine und Membranen. Im Nervengewebe kommen sie vor allem in den Myelinscheiden vor und können durch Radikale ebenfalls oxidativ modifiziert werden. Vor allem die sogenannten mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) sind, durch ihre Struktur bedingt, sehr anfällig auf Radikale.

Durch die Bestimmung des Liquor-Fettsäuremusters habe ich feststellen können, dass sowohl bei Alzheimer- als auch bei anderen Demenz-Patienten eine niedrigere Konzentration in allen Gruppen der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren gegenüber gesunden Kontrollen zu verzeichnen sind.

Aufgrund dieser Erkenntnisse kann man die Aussage, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren gegenüber oxidativen Bedingungen sehr anfällig sind, bekräftigen. Anhand von bereits durchgeführte Studien an gesunden Kontrollen in der Vergangenheit (Schippling et al., 2000) konnte ich eine signifikant erniedrigten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Liquor von Alzheimer-Patienten zeigen.

Durch den Vergleich des Liquor-Fettsäuremusters bei Alzheimer- und anderen Demenz-Patienten kann ich in meiner These, dass der oxidative Stress ebenfalls eine wichtige Rolle bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen spielt, bestätigt werden.

Ob die Oxidation von Lipoproteine und Fettsäuren im Liquor sowie der erniedrigte Gehalt an Antioxidantien, wie Ascorbat und α -Tocopherol, eine Rolle bei der Entwicklung von Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Parkinson und vaskuläre Demenzen, spielen, ist nicht eindeutig bewiesen. Anhand vergangener Studien und auch der vorliegenden Arbeit können wir zeigen, dass Lipoproteine im Liquor in vitro oxidiert werden können. Hinsichtlich dieser Tatsache wäre dieser Vorgang natürlich auch in vivo vorstellbar. Unter bestimmten Voraussetzungen, z.B. erhöhter Verbrauch von Ascorbat und anderen Antioxidantien, entstehen vermehrt Lipidhydroperoxide, die von sich aus eine Kettenreaktion auslösen könnten und so den oxidativen Stress noch weiter vorantreiben. Im Organismus sind auch physiologische Oxidantien, wie z.B. die Übergangsmetallionen Cu(II) und Fe(III) sowie die Lipoxygenase und A β , die durch aktivierte Mikroglia produziert werden und so diesen oxidativen Milieu verschlimmern (Drache et. al., 1997). Die oxidierten Lipoproteine im Liquor könnten zur Schädigung von Neuronen führen und auf diese Weise eine Neurodegeneration initiieren. Es ist auch vorstellbar, dass im Plasma oxidierte Lipoproteine die Blut-Hirn-Schranke passieren könnten und ebenfalls in das Geschehen eingreifen. Da die Lipoproteine im Lipidmetabolismus eine wichtige Funktion haben, würde sich deren Oxidation zusätzlich negativ auf den fortschreitenden neurodegenerativen Prozeß ausüben.

Aufgrund der verminderten Antioxidantienstatus bei beiden Patientenkollektive gegenüber gesunden Kontrollen, könnte man klinische Studien durchführen, ob eine Supplementation von Ascorbat und α -Tocopherol über Jahre sich positiv auf die Entwicklung bzw. den Verlauf der Erkrankung auswirkt. Ihre Beziehung zu pathologischen Vorgängen im Hirn von Alzheimer-Patienten ist am stärksten durch vorangegangene Studien zu vermuten. Des weiteren liegt der hier durchgeführten gemeinsamen Gabe die Überlegung zugrunde, dass für α -Tocopherol und Ascorbat eine Beeinflussung untereinander postuliert wurde. Neben der individuellen

antioxidativen Wirkung kann Ascorbat auch die Wirkung von α -Tocopherol verstärken bzw. aufrechterhalten, indem es die Regenerierung von α -Tocopherol-Radikalen unterstützt. Studien bei Parkinson-Patienten haben gezeigt, dass eine Vitamin-E-Supplementierung den Beginn einer L-Dopa-Therapie um 2-3 Jahre verzögern kann (Fahn et al., 1991). Andere Studien konnten belegen, dass eine Vitamin-C und E Gabe bei Alzheimer- und Parkinson-Patienten zu einer hochsignifikanten Erhöhung der Vitaminkonzentrationen im Plasma und Liquor führte.

Mit der vorliegenden Arbeit will ich feststellen, ob die Liquorlipoprotein-oxidation in der Pathologie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Parkinson etc., eine genauso wichtige Rolle spielt, wie bei der AD. Vergleichen wir die Ergebnisse von den anderen Demenz-Patienten mit denen der Alzheimer-Patienten, dann stelle ich fest, dass diese sich sehr ähnlich sind. Mit diesen Erkenntnissen kann ich meine Vermutung bekräftigen, dass die Liquorlipoprotein-oxidation ebenfalls eine Rolle in der Pathologie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen spielt.

Allerdings muss ich erwähnen, dass die Daten in der vorliegenden Arbeit ausschließlich in vitro gewonnen wurden und die Vorgänge in vivo sicherlich wesentlich komplexer sind.

6 Zusammenfassung

Ob der oxidative Stress in der Pathogenese der Alzheimer- und anderer neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle spielt, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Aber Anhand verschiedener Alzheimer-Studien werden wir in unserer Vermutung bestärkt, dass oxidative Mechanismen zur Pathologie der Alzheimer-Krankheit beitragen. Inwiefern die Oxidation von organischen Molekülen auch zur Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen beitragen, sollte mit der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Die Oxidationskinetik des Liquor cerebrospinalis von Alzheimer- und anderer Demenz-Patienten wird in der Abwesenheit (Autooxidation) und in der Anwesenheit von exogenen Oxidantien (AAPH) gemessen und diese miteinander verglichen. Die gewonnenen Messwerte der Liquores von 36 Alzheimer- und 7 anderer neurodegenerativ erkrankter Patienten ergab eine erhöhte Oxidationsrate in der Lag- und Propagationsphase bei Alzheimer-Patienten.

Es wurden auch die Konzentrationen der Fettsäuren und Cholesterin sowie der Gehalt an Ascorbat und α -Tocopherol im Liquor gemessen. Bei den Fettsäuren ergab sich ein erniedrigter Gesamtfettsäuregehalt bei den Alzheimer-Patienten gegenüber den anderen Demenz-Patienten. Ferner stelle ich bei Alzheimer-Patienten einen ebenfalls erniedrigten Gehalt an einfach ungesättigten Fettsäuren und einen erhöhten prozentualen Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren fest. Der Vergleich mit gesunden Kontrollen ergab einen erniedrigten Gehalt in allen Gruppen der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren bei beiden Patientenkollektiven.

Der Cholesteringehalt bei beiden Patientenkollektiven und den Kontrollen ergab kaum einen Differenz.

Die Konzentration von Ascorbat lag etwas höher als bei den anderen neurodegenerativen Erkrankungen. Der α -Tocopherol-Gehalt bei beiden Patientengruppen war annähernd gleich. Auch hier lagen die Konzentrationen von Ascorbat und α -Tocopherol beider Patientenkollektive signifikant niedriger als bei gesunden Kontrollen.

Mit den Ergebnissen meiner Arbeit kann ich meine Vermutung, dass der oxidative Stress in der Pathologie der AD eine Rolle spielt, nochmal unterstreichen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen ist es auch vorstellbar, dass die Oxidation von Lipoproteine und Fettsäuren sowie anderer organischer Moleküle im zentralen Nervensystem und der vermehrte Verbrauch von Antioxidantien (vor allem Ascorbat), ebenfalls zur Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen beitragen.

Literaturverzeichnis

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.

Boller F., Lopez O.L., Moossy J.
Diagnosis of dementia: clinicopathologic correlation.
Neurology 1989 Jan; 39 (1): 76-9.

Borghini I., Barja, F., Pometta, D., James R.W. (1995).
Characterization of subpopulation of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochem. Biophys. Acta* 1255, 192-200.

Brandt J., Rothlind J.C.
A brief assessment of frontal and subcortical functions in dementia.
J. Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1993 Winter; 5(1): 73-7.

Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-Vance M.A. (1993).
Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late-onset families. *Science* 261, 921-923.

Deibel M.A., Ehmann W.D., Markesberg W.R.
Copper, iron and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress.
J. Neurol. Sci. 1996 Nov; 143(A-2): 137-42.

Fahn S.
An open trial of high-dosage antioxidants in early Parkinson's disease.
Am. J. Clin. Nutr. 1991 Jan; 53 (1 Suppl.): 380S-382S.

Finckh B., Kontush A., Commentz J., Hübner C., Burdelski M., Kohlschütter A. (1999)
Sensitive HPLC techniques for the simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols, ubiquinol and ubiquinone in biological samples.
Methods Enzymol. 299, 341-348.

Geldmacher D.S., Fritsch T., McClendon M.C., Landrath G.
A Randomized Pilot clinical Trial of the Safety of Pioglitazone in Treatment of Patients with Alzheimer Disease.

Arch. Neurol. 2011; 68 (1): 45-50.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1989).
Free radicals in biology and medicine. Second Edition. Clarendon Press.
Oxford.

Homer A.C., Honava M., Lantos P.G., Hastie I.R., Kellet J.M., Millard P.H.
Diagnosing dementia: do we get it right?
BMJ. 1988 Oct. 8; 297 (6653): 894-6.

Hülser K. (2001).
Klinische Diagnostik im Rahmen der Qualitätssicherung. Diplomarbeit, Ruhr-
Universität Bochum

Iqbal K et. al. (1995).
Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders. John
Wiley & Sons Ltd.

Jimenez-Jimenez F.J., de Buster F., Molina J.A., de Andres C., Gasalla T.,
Orti-Pareja M., Zurdo M., Pota J., Castellano-Millan F., Arenas J., Enriquez-
de-Salamanca R. (1996).
Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol in patients with multiple
sclerosis. Neuroscience Letters 249, 65-67.

Koch S., Beisiegel U. (2000).
Lipoproteins in the brain: a new frontier? In Lipids and Vascular Disease.
D. J. Betteridge, editor. Martin Dunitz, London. 51-64.

Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S.,
Beisiegel, U. (2000).
Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and
plasma. Free-Radic-Biol-Med. 30(1): 119-28.

Kontush A., Finckh B., Beisiegel U., Korten B., Kohlschütter A. (1996).
Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and
low density lipoprotein.
Journal of Lipid Research 37, 1436-1448.

Kurz A., Müller U., Lautenschlager N., Attland K., Zimmer R., Busch R.,
Gerund I., Lauter H.
Apolipoprotein E type 4 allele and Alzheimer's disease: effect on age at onset
and relative risk in different age groups.
J. Neurol. 1996 Jun; 243 (6): 452-6.

Lang, E (1994). Altern-Alterskrankheiten-Geroprophylaxe. In H. Reimann (Hrsg). Das Alter. Einführung in die Gerontologie. Stuttgart: Enke Verlag pp. 282-318.

Lautenschlager N, Kurz A, Müller U.
Inheritable causes and risk factors of Alzheimer's disease. Nervenarzt, 1999; 195-205.

Lovestone, S. (1999).
Early diagnosis and the clinical genetics of Alzheimer's disease. J-Neurol. 246: 69-72.

Masuhr K, Neumann M (1998).
Neumann M (Hrsg) Neurologie. Duale Reihe, 4. Auflage.

Mielke R, Kessler J (1994).
Alzheimersche Erkrankung und andere Demenzen. Göttingen : Hogrefe.

Müller T. Alzheimer durch Insulinresistenz im Gehirn?
Ärzte Zeitung, Ausgabe vom 07.10.2010.

Rajput A.H., Offord K.P., Beard C.M., Kurland L.T. (1984).
Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality.
Ann Neurol. 16(3): 278-82.

Rocca et. al. (1991).
Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings.
Ann. Neurol. 30; 381-390.

Roses AD (1996).
Apolipoprotein E in neurology. Current opinion in neurology, 9:265-270.

Roses AD, Einstein G, Gilbert J, Goedert AD, Han S-H, Huang D, Hulette C, Masliah E, Perica K, Vance MA, Aunders AM, Schmechel DE, Strittmatter WJ, Weisgraber K-H, Xi P-T (1996).
Morphological, Biochemical and Genetic Support for an Apolipoprotein E Effect on Microtubular Metabolism.
ANN. NY. Acad. Sci. Jan. 17 777:146-157.

Sandbrink und Beyreuther et. al. (1997).

Cerebral changes and cerebrospinal fluid beta-amyloid in Alzheimer's disease: a study with quantitative magnetic resonance imaging. *Mol. Psychiatry*. 1997 Oct-Nov; 505-7.

Sandbrink und Beyreuther (1997).

Expression of the APP gene family in brain cells, development and aging. *Gerontology*, 1997; 119-31.

Schippling S., Kontush A., Arlt S., Berndt C., Weber W., Akopyan V., Beisiegel, U.

Amyloid-beta is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radic. Biol. Med.* 2001 Jan 1; 30(1): 119-28.

Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Daher, D., Buhmann, C., Stürenburg, H.J., Mann, U., Müller-Thomson, T., Beisiegel, U. (2000).

Increased Lipoprotein Oxidation in Alzheimer's Disease.

Free Radical Biolog & Medicine 28, 351-360.

Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Daher, D., Buhmann, C., Stürenburg, H.J., Mann, U., Müller-Thomson, T., Beisiegel, U. (1999).

Lipoprotein oxidation and Alzheimer's disease. In Iqbal, K., Swaab, D.F., Winblad, B. Wisniewski, H.M. (Hrsg) *Alzheimer's disease and related disorders*. 471-478.

Selkoe D.J., Hartley D.M., Walsh D.M., Ye C.P., Diehl T., Vasquez S., Vassily P.M., Teplow D.B.

Protofibrillar intermediates of amyloid-beta protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J. Neurosci.* 1999 Oct. 15; 19(20): 8876-84.

Selkoe D.J., Lemere C.A., Grenfell T.J.,

The AMY antigen co-occurs with beta and follows its deposition in the amyloid Plaques of Alzheimer's disease and down syndrome.

Am. J. Pathol. 1999 Jul; 155 (1): 29-37.

Selkoe D.J., Greenberg S.M., Koo E.H., Qin W.Q., Kosik K.S.

Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994 Jul 19; 91 (15): 7104-8.

Seshadri, S., Drachman, D.A., Lippa, C.F. (1995).

Apolipoprotein E e4 allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease. *Arch-Neurol.* 52: 1074-1079.

Smith M.A., Sayre L.M., Perry G., Harris P.C.
Iron accumulation in Alzheimer's disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997 Sept; 94(18): 9866-8.

Smith, M.A., Perry, G., Richey, P.L. (1996).
Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*. 382, 120-121.

Smith, M.A., Sayre, L.M., Monnier, V.M., Perry, G. (1995).
Radical ageing in Alzheimer's disease. *Trends-Neurosci*. 18, 172-176.

Stocker, R. (1994).
Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Current Opinion in Lipidology*. 5: 422-433.

Stocker R., Bowry V.W., Frei B.
Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991 Mar 1; 88(5): 1646-50.

Traber M.G., Sies H.
Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev. Nutr*. 1996; 16: 321-17.

Weisgraber et. al. (1994).
Apolipoprotein E Associates with β Amyloid Peptide of Alzheimer's disease to Form Novel Monofibrils.
J. Clin. Invest. Volume 94, August 1994, 860-869.

Wisniewski K.E., Dalton A.J., McLachlan C., Wen G.Y., Wisniewski H.M.
Alzheimer's disease in Down syndrome: clinicopathologic studies.
Neurolog 1985 Jul; 35(7); 957-61.

Danksagungen

Ich möchte mich zuerst ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Vergabe des Themas dieser Arbeit und darüber hinaus vor allem für Ihre Unterstützung und Betreuung während dieser Zeit bedanken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Abteilung molekulare Zellbiologie danke ich herzlich für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Dr. Anatol Kontush dem damaligen Leiter der Oxidationsforschungsgruppe für seine Betreuung.

Ich bedanke mich auch ganz besonders bei Dr. Sönke Arlt für seine Hilfsbereitschaft und hervorragende Weiterbetreuung.

Ich danke darüber hinaus Nicolette Donarski, Dorte Wendt und Christine Runge für deren Hilfsbereitschaft während und nach meiner Zeit im Labor.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig 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.

Hamburg, den 29.07.2011