

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II:
Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h. c. Ulrike Beisiegel

Vitamin E – und C- Supplementierung bei Alzheimer-Patienten über ein Jahr

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Katrin Semmler
aus Weimar

Hamburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität
Hamburg am: 04.06.2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/ in: Prof. Dr. D. Naber

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/ in: PD Dr. P. Nielsen

Inhaltsangabe

1	Zielsetzung der Arbeit	5
2	Einleitung.....	6
2.1	Die Alzheimer'sche Erkrankung	6
2.1.1	Epidemiologie	6
2.1.2	Klinik.....	7
2.1.3	Diagnose und Differentialdiagnose.....	9
2.1.4	Ätiologie und Risikofaktoren.....	12
2.1.5	Therapieansätze	14
2.2	Lipoproteine und Membranen	18
2.2.1	Lipoproteine im Plasma	19
2.2.2	Lipoproteine im Liquor	20
2.2.3	Lipidperoxidation	21
2.3	Oxidativer Stress.....	23
2.4	Antioxidantien	28
2.4.1	Vitamin E	29
2.4.2	Vitamin C	33
2.4.3	Andere Antioxidantien	36
3	Materialien und Methoden	38
3.1	Materialien	38
3.1.1	Patienten	38
3.1.2	Untersuchungsmaterial, deren Gewinnung und Aufbereitung	39
3.1.3	Geräte	40
3.1.4	Chemikalien, Verbrauchsmaterial.....	41
3.2	Methoden	42
3.2.1	Bestimmung von Plasma- und Liquorlipiden	42
3.2.2	Bestimmung der lipophilen Antioxidantien.....	45
3.2.3	Bestimmung hydrophiler Antioxidantien.....	47
3.2.4	Bestimmung der Oxidierbarkeit.....	49
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Charakterisierung der Patienten.....	51
4.2	Messung der Lipide im Plasma.....	53
4.3	Messung der Lipide im Liquor	55
4.4	Konzentration von Vitamin E im Plasma	57
4.5	Konzentration von Vitamin E im Liquor.....	59
4.6	Gegenüberstellung der Vitamin E – Konzentrationen im Plasma und im Liquor	61
4.7	Konzentration von Vitamin C im Plasma.....	61
4.8	Konzentration von Vitamin C im Liquor	64

4.9	Gegenüberstellung der Konzentration von Vitamin C im Plasma und im Liquor	65
4.10	Gehalt von Vitamin E und Vitamin C im Plasma	66
4.11	Gehalt von Vitamin E und Vitamin C im Liquor	66
4.12	Andere Antioxidantien im Plasma	67
4.13	Oxidationskinetik im Plasma	70
4.14	Oxidationskinetik im Liquor	71
5	Diskussion	78
6	Zusammenfassung	93
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang	101

1 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von vorausgegangenen Studien, die den Zusammenhang zwischen Lipoproteinoxidation und Alzheimer-Erkrankung [Schippling et al. 2000] und den protektiven Effekt der Vitamin C und E- Gabe an Alzheimer-Patienten über einen Monat [Kontush et al. 2001] belegten, wird in vorliegender Studie untersucht, ob eine Vitamin E und C-Supplementierung über zwölf Monate ähnliche Beobachtungen erlaubt. Es werden Plasma- und Liquorproben von 10 Alzheimer-Patienten aus der „Gedächtnissprechstunde“ verwendet, die ein Jahr mit 400 mg Vitamin E und 1000 mg Vitamin C täglich behandelt wurden. Die Proben werden vor, einen Monat nach und ein Jahr nach Vitamingabe gewonnen. Biochemisch werden verschiedene Parameter der Lipoproteinoxidation parallel in Plasma- und Liquorproben untersucht.

Dabei ist von Interesse, ob die zugeführten Vitamine angereichert werden, inwiefern erhöhte Konzentrationen beibehalten werden oder noch gesteigert werden und wie andere fettlösliche Antioxidantien im Plasma beeinflusst werden. Es sollte auch geklärt werden, ob die Beobachtungen der Plasma- und Liquorkonzentrationen Rückschlüsse über Transportmechanismen der Antioxidantien erlauben.

Im Vordergrund steht, die Zusammenhänge zwischen Lipidoxidation und gleichzeitigem Verbrauch von Antioxidantien zu ergründen.

Neben der Untersuchung der biochemischen Parameter wird der klinische Zustand der Patienten betrachtet, inwiefern sie von einer derart kostengünstigen und nebenwirkungsarmen Therapie profitieren können. Die Patienten sind neuropsychologisch getestet, diese Testergebnisse fließen in die Beurteilung ein.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer'sche Erkrankung

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung mit einer progredienten Hirnatrophie. Sie äußert sich klinisch durch zunehmende Demenz und den Verlust kognitiver Fähigkeiten. Die Erkrankung wurde erstmals 1901 von dem Breslauer Neurologen Alois Alzheimer (1864-1915) beschrieben und nach ihm benannt.

2.1.1 Epidemiologie

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist die zahlenmäßig bedeutendste Demenzform. Sie stellt 50 % aller dementiellen Erkrankungen dar. Sie liegt bei 5 % aller über 65-jährigen und bei 20 % aller über 80-jährigen vor. Mit zunehmendem Alter nimmt die Krankheitsrate exponentiell zu. Nach dem 65. Lebensjahr verdoppelt sich die Prävalenz der Alzheimer-Demenz alle 5 Jahre. Knapp die Hälfte der 95-Jährigen weist ein dementielles Syndrom auf. Allein in Deutschland leiden eine Million Menschen an der Alzheimer-Erkrankung, jährlich kommen etwa 150.000 hinzu [Die Zeit, 1. August 2002]

In Anbetracht der demographischen Bevölkerungsentwicklung kommt der Alzheimer'schen Erkrankung eine Bedeutung ungeahnten Ausmaßes zu, sozial, gesundheitspolitisch wie auch ökonomisch. In der Todesursachenstatistik der industrialisierten westlichen Welt rangiert die Alzheimer-Erkrankung an vierter Stelle nach dem akuten Myokard-Infarkt, malignen Neoplasien und zerebralem Insult [Schippling et al. 2000].

Als einzige dementielle Erkrankung bestehen bei der AD relevante Geschlechtsunterschiede. Frauen erkranken häufiger an Alzheimer-Demenz, haben im dementen Zustand niedrigere Mini-Mental-Test-Scores und verfügen über schlechtere verbale Fähigkeiten [Nedoschill et al. 1999]. Die Framingham-Studie [Bachman et al. 1992] zeigte Prävalenz für Alzheimer-Demenz für Frauen 3,01 %, für Männer nur 1,17 %. Im Alter über 75 Jahre für Frauen 7,82 %, für Männer 2,8 %. Erklärungen dafür werden nicht primär beim biologischen Geschlecht gesucht, sondern eher in geschlechtsassoziierten Faktoren wie niedrigerer Bil-

dung, im Lebensstil und häufigeren Depressionen in der Vorgeschichte als wahrscheinlichem Risikofaktor.

2.1.2 Klinik

Die ersten Anzeichen dieser Erkrankung sind vieldeutig und im allgemeinen sehr schlecht zu fassen. In der Regel beginnt die Erkrankung schleichend, typischerweise durch eine Phase leichter amnestischer Störungen charakterisiert. Gelegentlich kann sich eine solche Entwicklung unter ungewohnten Stressbedingungen (ein Krankenhausaufenthalt, Urlaub u.a.) zum ersten Mal offenbaren. Auch leichte extrapyramidalmotorische Auffälligkeiten, wie monotones Sprechen, Haltungsveränderungen, Hypomimie, Tremor, Rigor und Bradykinesie, können Anzeichen für den Beginn einer Demenz sein.

Die mit Abstand häufigste Beobachtung zu Beginn der Erkrankung stellt Vergesslichkeit dar, was wohl auch das Merkmal ist, welches in der Bevölkerung am ehesten mit der Alzheimer'schen Erkrankung in Verbindung gebracht wird. Zu den Erstmanifestationen können auch gehören: Verwirrheitszustände, Verlaufen, Agitation, Apathie, Aufmerksamkeits- und Konzentrationsstörungen, Depression, Wortfindungsstörungen. Oft kann man bei genauerem Hinschauen schon eine Einschränkung der alltäglichen Verrichtungen im gewohnten Umfeld erkennen, die jedoch in diesem Umfeld durch Gewohnheit leicht übersehen werden. Möglicherweise ziehen sich die Patienten vom sozialen Geschehen zurück, wirken müde und misstrauisch.

Im Fortschreiten der Krankheit verstärken sich zum Teil Störungen, die schon als mögliche Erstmanifestationen genannt wurden. Gedächtnisstörungen gelten als Leitsymptom der Alzheimer-Krankheit, mehr als 80% der Patienten leiden darunter. Dabei sind Kurz- und Intermediärgedächtnis stärker betroffen als das Langzeitgedächtnis. Meist erinnern sich Patienten an ihren Geburtstag, nicht jedoch an das aktuelle Datum.

Zu letztgenanntem Merkmal gehört auch eine mangelhafte Fähigkeit, aufmerksam und konzentriert Aufgaben zu erledigen. Verlangt eine Aufgabenstellung fokussierte Aufmerksamkeit, ist dies in der Regel noch eher zu bewältigen als

geteilte Aufmerksamkeit. Konkrete Aufgaben können leichter durchgeführt werden als solche, die eine gewisse Handlungsplanung erfordern.

Die Sprache ist vielfach beeinträchtigt, neben den schon genannten Wortfindungsstörungen beobachtet man eine Verminderung der Sprachproduktion, des Sprachflusses und des Informationsgehaltes des Gesagten. Fähigkeiten wie Zeichnen oder die Handhabung von Gegenständen gehen zunehmend verloren.

Seltener, aber deshalb nicht zu vergessen, leiden Alzheimer-Patienten unter wahnhaften Vorstellungen. Leicht werden solche Beobachtungen durch das eher misstrauische Verhalten fehlgedeutet, teils handelt es sich um eher verlegen gesuchte Erklärungen für vorher falsch Wahrgenommenes, Verlegtes oder Vergessenes.

Sind Selbstwahrnehmung und Ausdrucksmöglichkeiten der Patienten noch erhalten, beobachtet man gelegentlich dysphorische Reaktion auf die erkennbaren Leistungseinbußen. Eine gewisse Hilflosigkeit kann auch, vor allem in ungewohnter Umgebung, zu Angstzuständen mit vermehrter Reizbarkeit führen. Antriebssteigerung ist dabei eher bei mittelschwerer, Antriebsminderung bei schwerer bis schwerster Demenz zu erwarten.

Frauen sind oft durch andere Verhaltensweisen auffällig als ihre männlichen Leidensgenossen. Frauen sind emotional labiler, zurückgezogener, zeigen unangemessenes Lachen oder Weinen, haben die Tendenz, Vorräte zu horten und Hilfe zurückzuweisen. Männer hingegen sind eher psychomotorisch verändert, neigen zu Apathie, Ruhelosigkeit und stärkeren vegetativen Störungen wie übermäßiges Essen und Schlafen.

Bislang ungeklärt fand man häufig bei AD-Patienten ein niedrigeres Körpergewicht und Gewichtsverlust trotz ausreichender Ernährung. Häufig haben diese Patienten eine gestörte Wundheilung und dünnes Haar.

Als grobe Abschätzung ist im DSM-IV ein jährlicher Verlust von 3 bis 4 Punkten im MMSE als Korrelat der mentalen Verschlechterung aufgeführt, dies gilt im mittelschweren Demenzstadium.

Allgemein wird beobachtet, dass Patienten mit anfänglich höheren Testwerten noch mehr Reserven mobilisieren können, beziehungsweise über längere Zeit noch über bessere Kompensationsmechanismen verfügen. Die kognitive Ver-

schlechterung geht zunächst langsam voran und mündet erst bei mäßiger Demenz in eine beschleunigte Verschlechterung.

Im Durchschnitt beträgt die Lebenserwartung nach Diagnosestellung 5 bis 8 Jahre, wobei natürlich große interindividuelle Unterschiede möglich sind.

2.1.3 Diagnose und Differentialdiagnose

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist in erster Linie eine klinische Diagnose. Obwohl es histologische Charakteristika gibt, haben diese erst post mortem eine Relevanz.

Die NINCDS-ADRDA-Kriterien unterscheiden in wahrscheinliche, mögliche und definitive AD [McKhann et al. 1984]. Die definitive AD ergibt sich aus klinischen Kriterien und dem histopathologischen Nachweis entsprechender Veränderungen.

Zum Nachweis einer wahrscheinlichen AD muss zunächst ein Demenzsyndrom durch klinische Untersuchung und verschiedene Tests wie dem Mini-Mental-Test nachgewiesen werden. Anschließend wird eine systemische oder Hirnerkrankung ausgeschlossen. Grundlegend ist damit der Nachweis einer wahrscheinlichen AD gegeben. Ergänzende Kriterien sind: Defizite in zwei oder mehreren Bereichen der Kognition, fortschreitende Verschlechterung der Gedächtnis- oder anderer Kognitionsleistungen, keine Störung des Bewusstseins und ein Beginn im Alter zwischen 40 und 90 Jahren.

Der Mini-Mental-Status-Test ist eine neuropsychologische Testung, welche die folgenden kognitiven Fähigkeiten überprüft: Orientierung, Merkfähigkeit, Aufmerksamkeit und Rechenfähigkeit, Erinnerungsfähigkeit und Sprache. Maximal sind 30 Punkte zu erreichen. Auffällig sind Testwerte unter 27 Punkten. Ab 24 Punkten spricht man von einer leichten Demenz, unter 18 Punkten von einer mittelschweren Demenz und ab 11 Punkten von einer schweren Demenz.

Die Diagnose kann durch weitere Merkmale gestützt werden, so unter anderem durch Beeinträchtigung der „activities of daily living“, veränderte Verhaltensmuster und eine auf ähnliche neurodegenerative Erkrankung positive Familienanamnese. Psychometrische Testverfahren werden allgemein hin als Testverfahren der Wahl verwendet, um symptomatische Verbesserung kognitiver Leistun-

gen über kurze Zeitverläufe zu beurteilen. Möglicherweise sind jedoch funktionelle und Beschäftigungsverfahren bessere Indikatoren der kognitiven Kapazitäten der Patienten [Sano et al. 1997].

Apparative Untersuchungen liefern folgende Hinweise: Im Liquor liegt eventuell eine leichte Eiweißerhöhung im Sinne einer Schrankenstörung vor, das Elektroencephalogramm zeigt uncharakteristische Verlangsamung der Grundfrequenz in den Bereich von 4-8/s mit Einstreuung langsamerer Wellen, im Computertomogramm zeigt sich besonders fronto- und parietotemporal eine Hirnvolumenminderung (Verbreiterung der Sulci mit Verschmälerung der Windungen und mäßige Ventrikelerweiterung) und letztendlich im Positronen-Emissionstomogramm eine Hirnstoffwechselstörung mit verminderter Durchblutung und vermindertem Glucose- und Sauerstoffverbrauch. Oft sind die genannten Merkmale jedoch apparativ erst dann erkennbar, wenn das Demenzsyndrom auch klinisch deutlich ist.

Auf neurophysiologischer Ebene bietet die Alzheimer'sche Erkrankung einen Mangel verschiedener Neurotransmitter. Am deutlichsten zeigt sich im Cortex von Alzheimer-Gehirnen der Verlust von cholinergen Markern, von Cholinacetyltransferase und von Acetylcholinesterase. Parallel findet man einen Mangel an Serotonin, Noradrenalin, Somatostatin und Corticotropin-Releasing-Factor. Weiteren Diagnosekriterien wurden nach dem DSM-IV und ICD-10 aufgeführt.

Allen ist gemeinsam, dass die kategoriale Unterscheidung zwischen präseniler und seniler Demenz größtenteils aufgegeben wurde, da die Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersgruppen den Gemeinsamkeiten zwischen beiden deutlich unterliegen. Einzig die Betonung auf Defizite im temporo-parietalen Bereich sind ausgeprägter bei Patienten mit frühem Krankheitsbeginn. Das Merkmal der „Familiarität“ ist ebenfalls bei Patienten mit präseniler Manifestation häufiger zu finden.

Grundsätzlich kommen als Differentialdiagnose alle anderen primären und sekundären Demenzsyndrome in Betracht. Hirntumore (hier vornehmlich im Frontalhirn), Encephalitiden, Encephalopathien (hier besonders metabolisch und vaskulär bedingte) und Hydrocephalus sind oft wie die Alzheimer'sche Krankheit gerade in den Frühsymptomen unspezifisch.

Als primäre Demenzsyndrome sind die Pick-Krankheit, die Binswanger-Krankheit, die Creutzfeld-Jakob-Krankheit, das Mast-Syndrom (präsenile Demenz mit Gangstörung), die präsenile Demenz mit spastischer Paraparese und die Kraepelin-Krankheit (rasch progrediente präsenile Demenz) zu nennen.

Neuropathologisch charakteristisch ist die sogenannte Alzheimer-Trias. Dazu gehören **Plaque-Bildungen** (konzentrische Amyloidablagerungen im Neuropil von Ganglienzellen mit konsekutiver degenerativer Zytoskelettschädigung in umliegenden Nervenzell- und Astrozytenfortsätzen), **Neurofibrillen** (Bildung und Ansammlung von helikalen Doppelfilamenten zusammen mit Stressprotein Ubiquitin und Mikrotubuli-assoziiertem Protein „tau“ in geschädigten Nervenzellfortsätzen; es wird ein Ungleichgewicht zwischen Kinasen und Phosphatasen vermutet, welches in die Bildung von Neurofibrillen mündet) und **Amyloidangiopathie** (Amyloidablagerungen in der Hirngefäßen, Färbung kongophil).

Es werden daneben andere Phänomene beobachtet: Hirano-Körperchen, granulo-vakuoläre Einschlüsse, kondensiertes Chromatin, reduzierte DNA-Expression und erhöhte Membranpermeabilität in verschiedenen Zelltypen.

Die neurofibrillären Veränderungen werden nach Stadien eingeteilt, zum Beispiel Stadium I bis VI in Bezug auf die Lokalisation [Braak und Braak 1991].

Der Schlüsselaspekt des Ausmaßes kognitiver Leistungseinbuße im Rahmen einer neurodegenerativen Erkrankung ist selektiver Untergang von Neuronen.

Schaden, der vor allem durch oxidativen Stress und damit verbundene freie Radikale auf Zellen verursacht wird, trifft alle Neuronen, die in Alzheimer-Gehirnen verletzbar sind, nicht nur solche, die Neurofibrillen enthalten.

Proteine im Hirn, wie Neurofilamente und Tau-Protein bilden nicht-kovalente flüchtige cross-linked Aggregate, auch in Abwesenheit oxidativer Prozesse, möglicherweise werden kovalente Bindungen gebildet, die durch oxidative Veränderungen der Seitenketten an deren Stelle treten und zu einem „Einzementieren“ ursprünglicher lösbarer Bindungen führen. Der geregelte turn-over der Zellen ist so behindert [Rottkamp et al.2000].

Als letzten Ausblick seien noch zwei mögliche Marker für AD genannt. Bei Alzheimer-Patienten wurden erhöhte Mengen von p97, einem Eisen bindenden Protein, im Blutserum und im Liquor gefunden. Es könnte als Marker Verwen-

derung finden, zur Identifikation von Alzheimer-Patienten, Verlaufsbeurteilung der Erkrankung und Objektivierung möglicher Therapieerfolge [Kennard et al. 1996].

Eine Verwendung als quantitativer Marker der Erkrankung verspricht F_2 -isoprostane, welches bei AD-Patienten im Liquor erhöht ist. F_2 -isoprostane entsteht bei der Peroxidation von Arachidonsäure.

2.1.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Kenntnis von Risikofaktoren ermöglicht eventuelle vorbeugende Maßnahmen. Als solche sind genannt: das Alter, Vorhandensein von Apo E4-Allelen, eine positive Familienanamnese bezüglich Alzheimer'scher Krankheit (erhöht das Risiko um Faktor 2 bis 4) oder Demenz, eine Kopfverletzung, niedrige Bildung, schwache Sprachfähigkeit im jungen Alter.

Eine Hypothese besagt, dass die Alzheimer'sche Erkrankung nur eine Extremvariante oder eine zeitlich akzelerierte Variante physiologischen Alterns ist. Symptome wie kognitive Defizite, Persönlichkeitsveränderungen und neuropathologische Veränderungen kommen auch im physiologischen Altern vor, es bestehen fließende Übergänge zur AD.

Viele Gene sind im Laufe der letzten zehn Jahre im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Erkrankung identifiziert worden, sowohl solche, die an der „early-onset“-Form der Erkrankung, als auch solche, die an der spät in Erscheinung tretenden Form beteiligt sind. Für diese Gene wurde ein direkter kausaler Zusammenhang festgestellt.

Das Amyloid-Precursor-Protein (APP), welches auf Chromosom 21 lokalisiert ist, ein atypisches Protein kodiert und sich dann zu β -Fibrillen zusammenlagert, und die Presenilin-Gene 1 und 2, die sich auf Chromosom 14 und 1 befinden, sind der früh in Erscheinung tretenden Form zugeordnet. Die Preseniline sind hoch homologe Proteine innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates mit 8 Transmembran-Domänen. Sie stehen mit der Festlegung des Schicksals der Zelle in seiner weiteren Entwicklung und mit Zell-zu-Zell-Adhäsionen in Verbindung.

Dieser Zusammenhang wird durch die Kenntnis über einen anderen genetischen Defekt untermauert. Die Trisomie 21, auch Down-Syndrom genannt, zeigt neurodegenerative Symptome, die denen der Alzheimer'schen Erkrankung ähnlich sind, wenn nicht gar identisch. Neuronaler Zelltod wird durch Apoptosis herbeigeführt, die mit erhöhter Lipidperoxidation in Verbindung steht.

Apolipoprotein E (apo E), auf Chromosom 19 lokalisiert, das α_2 -Makroglobulin auf Chromosom 12 und weitere noch nicht identifizierte Gene sind der „late-onset“ und sporadischen Form zugeordnet.

Mutationen in diesen Genen fördern die erhöhte Produktion eines β -Amyloid-Proteins, welches um zwei oder drei Aminosäuren länger ist als das nicht pathologische β -Amyloid von 40 Aminosäuren Länge.

Amyloid β ($A\beta$) ist in niedrigen Konzentrationen (0,1-1 nM) im Liquor und Plasma von sowohl AD-Patienten als auch gesunden Personen vorhanden. Das entspricht etwa einem Molekül $A\beta$ auf 100 Lipoprotein-Partikel. Die physiologische Funktion der $A\beta$ -Produktion und -Sekretion ist nach wie vor unbekannt. Seine Tätigkeit in Bezug auf Lipidperoxidation wird durch zwei seiner Eigenschaften vermittelt: zum einen Bindung von Übergangsmetall-Ionen in ihrer inaktiven Form als antioxidative Wirkung, zum anderen Reduktion von Übergangsmetall-Ionen mit folgender Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als prooxidative Wirkung.

Um die Oxidation anzukurbeln, muß es in Konzentrationen im Größenbereich von μM statt nM vorliegen. Bei Konzentrationen im nM-Bereich ist $A\beta$ nicht toxisch und übt eine positive Wirkung auf Neuritenauswuchs, neuronale Adhäsion und Zellsignale aus. Ein Fragment des β -Amyloids, welches die Reste 25 bis 35 enthält, trägt wahrscheinlich die zytotoxischen Eigenschaften. Es wird darüber eine Glutamat-Toxizität vermittelt, die konzentrationsabhängig ist. Konzentrationen über 10^{-8}M dieses Peptids verstärken die Toxizität, Konzentrationen zwischen 10^{-9} und 10^{-12}M jedoch schützen die Zellen vor der Glutamat-Toxizität [Behl et al. 1992]. In ähnlich niedrigen Konzentrationen wirkt das Fragment des $A\beta$ antioxidativ.

Apolipoprotein E ist schon lange für seine Rolle im Plasma-Lipid-Metabolismus bekannt, dort steht es vor allem mit Chylomikronen, VLDL und HDL in Zusammenhang und vermittelt deren Wechselwirkung mit den Lipoprotein-Rezeptoren.

Apo E im Gehirn wird hauptsächlich von Astrozyten synthetisiert. Das Apolipoprotein E ist im Gehirn der entscheidende Cholesterin-Carrier. In Populationen europäischen Ursprungs findet man die drei apoE-Allele in verschiedener Frequenz: E3 am häufigsten mit 70-80 %, E4 mit 12-14 % und E2 mit 6-10 %. Zwischen den Populationen variiert die Allelfrequenz.

Apo-E 4 ist mit erniedrigten ApoE-Konzentrationen und höheren Cholesterinwerten im Plasma (und demzufolge einem höheren Atherosklerose-Risiko) verbunden.

Das ApoE 4- Allel ist mit der spät ausbrechenden familiären Form und der sporadischen Form der Alzheimer'schen Erkrankung verknüpft. An sich wirkt sich Apo E vorteilhaft für neuronale Schutzvorgänge aus, jedoch bestehen Unterschiede in der Effektivität der verschiedenen Isoformen. Apo E4 ist nicht toxisch, sondern nur am wenigsten in der Lage, schützend gegen freie Radikale zu wirken. Diejenigen AD-Patienten mit dem E4-Allel sind anfälliger für Lipidperoxidation. Im AD-Gehirn ist die Menge an peroxidativen Prozessen dem Gehalt an apo E umgekehrt proportional [Ramassamy et al. 1998].

Träger von einem oder zwei E4-Allel zeigen ein deutlich niedrigeres Ersterkrankungsalter als Patienten ohne dieses Allel. Im Sinne eines Gen-Dosis-Effekts weisen Träger zweier E4-Allele im Vergleich zu allen anderen Genotypen das maximale Erkrankungsrisiko auf. Die Krankheitsdauer ist jedoch nicht mit dem apoE assoziiert. Hierbei gilt: je früher der Krankheitsausbruch, desto länger die Krankheitsdauer. Unabhängig vorhandener Demenz ist die Menge der Amyloid-Ablagerungen mit den verschiedenen apoE-Genotypen assoziiert.

2.1.5 Therapieansätze

Behandlungsansätze bei der Alzheimer-Demenz zielen einerseits auf die kognitiven Leistungsstörungen, andererseits auf die nicht-kognitiven psychopathologischen Störungen.

Da bei dem Krankheitsbild verschiedene ätiopathogenetische Modelle existieren, haben auch die Therapieoptionen verschiedene Ansatzpunkte [Heidrich, 1997].

- 1) Acetylcholin-Mangel-Hypothese
- 2) Störungen des Hirnenergiestoffwechsels
- 3) Amyloidhypothese
- 4) Beeinträchtigung der Neuroprotektion (oxidativer Stress) und nicht-enzymatische Bildung von Glykosylierungsprodukten
- 5) Störungen der Neuroplastizität
- 6) immunologische Faktoren

Das zentrale cholinerge Neurotransmittersystem ist gestört in AD. Im Cortex und Hippocampus sind die Acetylcholinesterase-Mengen um 58 bis 93% reduziert. Viele Jahre bestand einzig und allein der Ersatz mangelnder Neurotransmitter als Therapieoption. Cholinesterase-Inhibitoren wie Aricept[®], Cognex[®] und Tacrine Hydrochloride[®] erhöhen die Acetylcholin-Konzentrationen im Gehirn.

Eine britische Studie fand über epidemiologische Studien einen möglicherweise positiven Effekt von Statinen. Statin-Nutzer haben ein um 70% niedrigeres Alzheimer-Risiko [Die Zeit, 1. August 2002]. Statine senken den Apolipoprotein E-Gehalt und Cholesterin. Dies könnte mit einer Verminderung der durch Cholesterin modulierten A β -Bildung in Neuronen in Zusammenhang stehen.

Amyloid-Ablagerungen bringen eine entzündliche Komponente in Kontakt mit dem neurodegenerativen Geschehen [Stewart et al. 1997]. Nicht-steroidale Antiphlogistika können das relative Risiko verringern, eine Alzheimer-Erkrankung im Verlauf zu entwickeln und somit die Inzidenz um bis zu 50 % senken [Breitner et al. 1994].

Primäres Ziel der AD-Therapie sind die eigentlichen neuropathologischen Veränderungen, also die Plaques, die hauptsächlich aus Amyloid β -Protein aufgebaut sind. Großen Enthusiasmus rief eine Antikörper-vermittelte A β -Beseitigung hervor. Transgene Mäuse konnten so aktiv und passiv gegen A β geimpft werden und zeigten deutlich geringere Amyloid-Ablagerungen [Bard et al. 2000]. Die Versuche an AD-Patienten mußten abgebrochen werden, nachdem 8 von 360 Patienten eine Meningoencephalitis entwickelten (Die ZEIT, 7. Februar

2002). Andere Wirkmechanismen wie inkalierende Stoffe in die A β -Ablagerungen, die die Vernetzung zu Fibrillen verhindern, sind angedacht.

Ein weiterer neuropathologischer Ansatzpunkt sind die Neurofibrillen. Sie sind aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein aufgebaut. Theoretische Überlegungen betreffen unter anderem Mikrotubulus-Stabilisatoren, Phosphorylierungs-Inhibitoren, Phosphatasen und Tau-Anti-Aggregantien [Irizarry et al. 2001].

Östrogenmangel erhöht das Risiko für Erkrankung an Alzheimer-Demenz. [Paganini et al. 1996], siehe auch 1.1.1. Studien fanden, dass eine Östrogensubstitution nach der Menopause das Risiko einer AD um ein Drittel senkt. Patientinnen unter gleichzeitiger Gabe von Tacrin[®] und Östrogen konnten die kognitiven Leistungen auf das Doppelte verbessern im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die nur Tacrin bekam [Schneider et al. 1996].

Östrogen kann Neuroblastom-Zellen vor oxidativem Stress schützen. Außerdem unterdrückt es die durch β -Amyloid initiierte Membranoxidation in Neuronen des Hippocampus, wirkt als Modulator der ApoE-Expression und der A β -Ablagerungen [Rottkamp et al. 2000].

Als zentrale Therapieoption, worauf die vorliegende Arbeit basiert, werden Antioxidantien eingehender betrachtet. Antioxidantien sind in der Lage, frühesten Quellen oxidativen Stresses entgegenzuwirken.

Antioxidantien als therapeutische Option bieten zwei entscheidende Vorteile, erstens sind viele solcher Radikalfänger bekannt, zum anderen bietet die Großzahl keinerlei bedeutsame Nebenwirkungen, selbst in hohen Dosen wie 3200 mg pro Tag. Das ideale Medikament gegen Alzheimer sollte prophylaktisch in der alternden Bevölkerung angewendet werden können. Nicht unbedeutend sind die geringen Therapiekosten von Antioxidantien.

Die Vitaminmengen sind so bemessen, dass der überwiegende Teil der Bevölkerung dieser Empfehlung nachkommen und klinische Mangelsymptome vermeiden kann. Heutzutage werden – zumindest in der industrialisierten Welt – höhere Anforderungen an die Vitaminempfehlungen gestellt, und zwar die Möglichkeit durch erhöhte Vitaminzufuhr nicht nur Mangel zu vermeiden, sondern auch zusätzlichen Gesundheitsgewinn daraus zu erzielen. In diesem Kontext steht die diskutierte protektive Dosis in Bezug auf die Alzheimer'sche Erkrankung. Die

dafür benötigte tägliche Vitaminzufuhr ist aber schwerlich über gewöhnliche Nahrungsmittel zu erreichen, nur über Einnahme spezieller Vitaminpräparate. Darüber herrscht nach wie vor Uneinigkeit, manche Autoren empfehlen schon jetzt Vitamin-Präparate, andere propagieren Zurückhaltung und empfehlen eine gesunde, an Obst und Gemüse reiche Diät bis zur genaueren Erforschung der biologischen Mechanismen der Vitamine.

Der Vitaminbedarf im Alter unterscheidet sich von jüngeren Menschen. Durch verminderten Energiebedarf und dadurch geringerer Nahrungsaufnahme muss die durchschnittlich enthaltende Vitaminmenge umso größer sein. Im Alter ist außerdem mit einer immer weniger effektiven Absorption schwer absorbierbarer Nahrungsbestandteile (wie Carotinoide) zu rechnen, was zum Teil auch auf die häufige Einnahme einer Vielzahl von Medikamenten, eine herabgesetzte Fähigkeit zur Retention von Vitaminen und erhöhte Ausscheidungsverluste zurückzuführen ist. Zeichen einer Mangelversorgung mit Vitaminen können sein: erhöhte emotionale Labilität, Depressivität, Erregtheit, Müdigkeit, Empfindlichkeit und verminderte Gedächtnisleistungen.

Als Präventivmaßnahme wird die tägliche Einnahme von 30-60 mg Vitamin E, 100-150 mg Vitamin C und 15 mg β -Carotin empfohlen [Thome et al. 1994].

EGb761 als Extrakt von *Ginkgo biloba* hat vor allem auf kognitive Leistungen einen positiven Effekt. Daneben schützt es Neurorezeptoren im alternden Hirn.

Coenzym Q (Ubichinol) ist fraglich therapeutisch geeignet. In einer Studie [Imagawa et al. 1991], die auf eine Verbesserung der mitochondrialen Atmungskette ausgelegt war, stellte sich nach achtwöchiger Gabe von 60-180 mg Coenzym Q und 180 mg Vitamin B₆ lediglich eine Besserung des psychopathologischen Befindens und der Bewältigung des Alltags ein. Vitamin E ist der effektivste antioxidative Schutz gegen Lipidperoxidation. Da jedoch neben Lipidperoxidation auch Oxidation von Proteinen und DNA eine Rolle spielen, kann auch Vitamin E nur teilweise wirksam sein. Selegilin-Gabe (soll als Hemmstoff der Monoaminoxidase die Radikalentstehung durch die Metabolisierung von Dopamin und Noradrenalin verhindern) in Verbindung mit Vitamin E verzögerte in einer auf 2 Jahre angelegten Studie bei AD-Patienten die funktionelle Verschlechterung, besonders in Bezug auf die Institutionalisierung. Er empfiehlt die Therapie Patienten mit einer mäßigen Demenz [Sano et al. 1997].

Auch die schon genannten Nicht-Steroidalen Antiphlogistika wirken indirekt antioxidativ, indem sie über die Cyclooxygenase die Prostaglandinsynthese verringern und indem sie über die verminderte Glutamat-vermittelte Toxizität die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bremsen.

Eine Therapie mit Desferroxiamin, der als Eisen-Chelator fungiert, verspricht, über die Verringerung von Übergangsmetallen kontrollierend auf die Eisen-abhängige Lipidperoxidation einzuwirken. Nach einer zweijährigen Verabreichung zeigte sich, dass klinisch das Fortschreiten der Krankheit verlangsamt wurde [Crapper McLachlan, 1991].

Idebenon als spezielles Antioxidanz für mitochondrialen oxidativen Stress wurde in einer zweijährigen Studie getestet, und konnte darin ebenfalls das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen [Gutzmann et Hadler, 1998].

Dem zweiten Behandlungsansatz werden Medikamente gegen Verhaltensauffälligkeiten gerecht. Je nach Symptomen gibt man Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer gegen Depression; Neuroleptika, Anxiolytika, Antikonvulsiva, Antidepressiva gegen Angst- und Agitationszustände; Modafinil und Methylphenidate gegen Hypersomnolenz.

2.2 Lipoproteine und Membranen

Für den Menschen ist die Versorgung mit Lipiden lebensnotwendig. Im wässrigen Milieu des Körpers können jedoch lipophile Substanzen nicht ohne weiteres transportiert werden. Lipoproteine sind Aggregate aus Proteinen und Lipiden mit variabler Größe und Zusammensetzung.

Die Lipoprotein-Komplexe sind kugelförmige Aggregate, mit einem Kern von unpolaren Lipiden, das sind vor allem Triacylglycerole und Cholesterol-Acylester. Umgeben sind sie von einer etwa 2 nm dicken Hülle aus Apolipoproteinen und amphipatischen Lipiden, so vor allem Phospholipide und Cholesterol. Diese Schicht ist nach außen polar und hält dadurch die Lipide im Plasma löslich. Je größer der Anteil der unpolaren Lipide im Kern ist, desto geringer ist die Dichte der Lipoprotein-Komplexe. Apolipoproteine sind Strukturproteine der Lipoproteine, sie beteiligen sich an der Lipidresorption, Aktivierung der Li-

poproteinlipase und an der Steuerung der Lipolyse. Sie kommen alle in unterschiedlicher charakteristischer Menge in verschiedenen Lipoproteinen vor.

Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus einer Lipid-Doppelschicht. Ihre hydrophilen Enden sind auswärts gerichtet, ihre lipophilen Enden gegeneinander nach innen. Proteine sind in die Doppelschicht eingebettet. Die Bestandteile der Membran sind durch nebenvalente Bindungen zusammengehalten, wodurch die gegeneinander beweglich sind. Dies verleiht der Membran einen flüssigen Charakter. Die Fluidität hängt von der Zusammensetzung der Lipide und der Umgebungstemperatur ab. Je mehr ungesättigte Fettsäuren eingebettet sind, desto höher ist die Fluidität. Diese sind jedoch sehr anfällig für angreifende freie Radikale, die so die Lipidperoxidation in Gang setzen.

2.2.1 Lipoproteine im Plasma

Die Lipoprotein-Komplexe werden in fünf Klassen unterteilt. Die Einteilung erfolgt hinsichtlich abnehmender Größe und zunehmender Dichte. Untenstehende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteinklassen.

Chylomikronen sind die größten mit geringster Dichte, sie transportieren die Nahrungslipide vom Darm zu den Geweben. VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein) und LDL (low density lipoprotein) folgen in abnehmender Größe. Sie transportieren Triacylglycerole, Phospholipide und Cholesterol von der Leber zu den Geweben.

LDL sind sphärische Moleküle von 19-25 nm Durchmesser. Jedes Partikel enthält etwa 600 Moleküle Cholesterol, 1600 Moleküle Cholesterolester und 170 Moleküle Triglyceride. Der Kern ist in eine Einzelschicht von etwa 700 Phospholipidmolekülen eingehüllt. Apoprotein B ist in die äußere Schicht eingebettet.

HDL (high density lipoprotein) transportiert das in den Geweben gebildete, überschüssige Cholesterol wieder zurück zur Leber.

	Chylomikronen (bis 0,9 g/ml)	VLDL (bis 1,006 g/ml)	LDL (bis 1,063 g/ml)	HDL (bis 1,21 g/ml)
Größe (nm)	100-1000	30-70	15-70	7,5-10
Eiweiß*	0,8-2,5	8-12	20-24	40-80
Phospholipide*	4-9	16-20	20-24	20-37
Cholesterin*	0,5-1	6-8	7-9	2-7
Cholesterinester*	1-2,5	12-14	35-40	5-10
Triglyceride*	87-94	45-55	8-12	1-5
Apolipoproteine	A, B, C	A, B, C	B	A

* Lipidfraktionen in Prozent des Gesamtgewichts

Angaben nach Pschyrembel, 257.Auflage

2.2.2 Lipoproteine im Liquor

Es ist nur wenig bekannt über die Struktur und Funktion von Lipoproteinen im Liquor. Menschlicher Liquor enthält sphärische und diskoidale Lipoproteinpartikel, die sich von denen im Plasma unterscheiden. Möglicherweise ähneln sie der Fraktion der HDL des Plasmas.

Im Liquor gibt es kein Apolipoprotein B, zumindest konnte es bislang nicht nachgewiesen werden. Apolipoprotein E wurde bislang als einziger Ligand für LDL-Rezeptoren im Gehirn nachgewiesen.

Die Konzentration von Lipiden im menschlichen Liquor beträgt nur 10-20 mg/l, was unter 0,2% der Konzentration im Serum entspricht.

Das ZNS hat Mechanismen für den Lipidtransport und die Cholesterol-Homöostase, die denen anderer Gewebe ähnelt [Vatassery et al. 1991].

Nachfolgende Tabelle zeigt die Konzentration unterschiedlicher Lipide im Liquor.

	Liquorkonzentration
Gesamtlipide	20,3 mg/l
Gesamtcholesterin	10,4 µmol/l
Freies Cholesterin	5,0 µmol/l
Cholesterinester	5,3 µmol/l
Phospholipide	9,2 µmol/l

[nach Arlt, 2000]

Verschiedene Studien zeigten, dass Alzheimer-Patienten eine deutlich veränderte Protein- und Lipidzusammensetzung der Lipoproteine im Liquor aufweisen. Die Studien weisen jedoch kein einheitliches Muster auf. Eine Studie fand keine signifikanten Unterschiede in Phospholipiden, einen um die Hälfte reduzierten Gesamtproteingehalt und Unterschiede in Cholesterylestern (relativer Zuwachs der gesättigten und Abfall der mehrfach ungesättigten Fettsäuren) [Montine et al. 1997]. Eine andere Studie fand in post mortem -Hirnen von AD-Patienten ApoE, Gesamtprotein und Cholesterin signifikant verringert, Phospholipid 17-fach verringert und Fettsäuregehalt 5-fach verringert [Mulder et al. 1998]. Eine Studie in unserem Labor fand keinen Unterschied im Gehalt von Gesamtprotein, Cholesterin und Gesamtfettsäuren. Die relative Menge an mehrfach ungesättigten Fettsäuren war signifikant höher und gesättigte Fettsäuren waren relativ erniedrigt [Schippling et al. 2000].

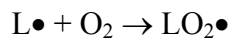
2.2.3 Lipidperoxidation

Reaktive freie Radikale können Wasserstoffatomen aus den Seitenketten mehrfach ungesättigter Fettsäuren lösen. Es wird von der Methylengruppe zwischen zwei Doppelbindungen ein Wasserstoffatom abstrahiert. Das Kohlenstoff, von dem Wasserstoff abgespalten wurde, besitzt nun ein ungepaartes Elektron. Liegt das Kohlenstoff-Radikal im hydrophoben Inneren von Membranen, reagiert es am wahrscheinlichsten mit Sauerstoff. Das entstehende hochreaktive Peroxyl-Radikal greift angrenzende Proteine und mehrfach ungesättigte Fettsäuren an. Damit ist die sogenannte Freie-Radikal-Kettenreaktion in Gang gesetzt.

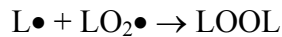


Phospholipide enthalten stark oxidierbare mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure und Docosahexensäure. Durch ihre Doppelbindungen, die leichten Zugriff auf Wasserstoffionen bieten, sind sie besonders verletzlich.

Das wahrscheinlichste Schicksal von Lipid-Radikalen ist die molekulare Umordnung zu konjugierten Dien-Strukturen, an die sich eine Reaktion mit Sauerstoff anschließt. Als deren Produkte entstehen konjugierte Dien-Peroxyl-Radikale.

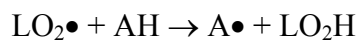


Die Peroxidation beschleunigt sich autokatalytisch, bis ein bedeutender Prozentsatz der sich fortpflanzenden Peroxyl-Radikale sich selbst limitierend verbraucht hat, zum Beispiel



Die Peroxidation ist durch den Verbrauch oxidierbaren Substrates (ungesättigte Fettsäuren, Sauerstoff, etc.) limitiert.

Antioxidantien (AH) kompetieren mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren um die sich fortpflanzenden Radikale.



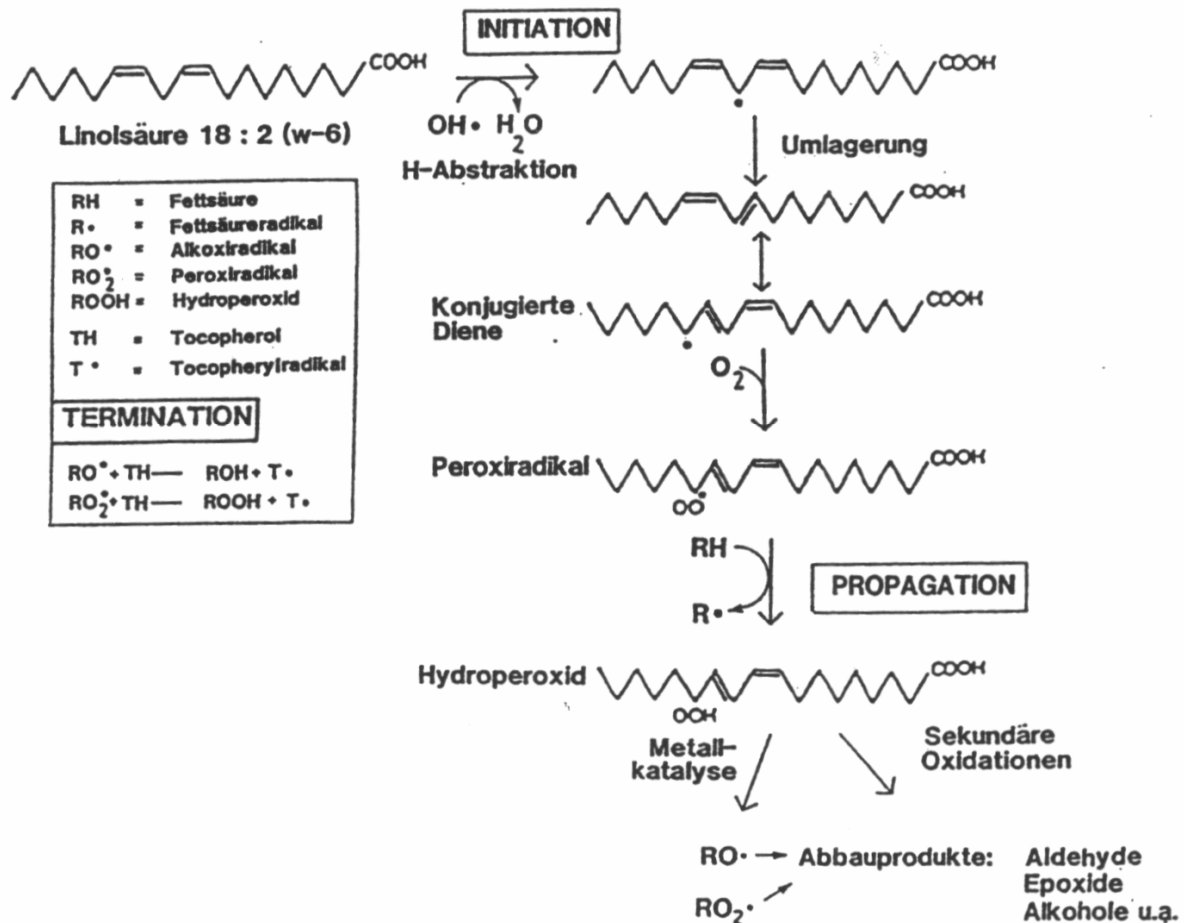
Um effektiv zu sein, darf das Antioxidanz nicht in der Lage sein, Wasserstoff von ungesättigten Fettsäuren abzuspalten, oder zumindest sehr viel schwächer als Peroxyl-Radikale.

Das aktuelle Konzept der Oxidation in AD ist erweitert worden und schließt neben Membranlipiden und – proteinen auch Lipoproteine als Angriffsort der Oxidation ein.

In der Literatur wird vermutet, dass die größten oxidativen Schäden an vielfach ungesättigten Fettsäuren geschehen. Wahrscheinlich wird jedoch nur ein kleiner Teil der potentiell oxidierbaren Fettsäuren problemlos angegriffen, während der Großteil dem Angriff lange Zeit widersteht [Esterbauer et al. 1987].

Die folgende Darstellung verdeutlicht den beschriebenen Mechanismus.

MECHANISMUS DER LIPIDPEROXIDATION



2.3 Oxidativer Stress

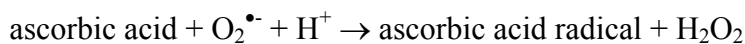
Oxidativer Stress wird mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht, wozu neben neurodegenerativen Störungen wie die Alzheimer'sche Erkrankung auch normale Altersprozesse, Emphysem, Diabetes und Atherosklerose gehören.

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].

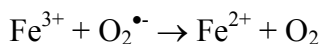
Neuronen, die in der Alzheimer'schen Erkrankung oxidativem Stress ausgesetzt sind, sind besonders empfindlich gegenüber freien Radikalen. Hier seien einige

Besonderheiten genannt. Der Gehirnstoffwechsel erfordert beträchtliche Mengen an Sauerstoff in einer besonders lipidreichen Umgebung. Auch die Membranen von Neuronen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus. Glutathion als wichtiges natürliches Antioxidanz kommt nur in geringen Mengen in Neuronen vor. Gleichzeitig sind primäre Neuronen postmitotische Zellen und bedürfen besonderen Schutzes. Im Gehirn sind sich Substrat, freie Radikale und Katalysator örtlich sehr nahe.

Freie Radikale sind definiert als jedes zur selbstständigen Existenz befähigte Atom oder Molekül, welches ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in seiner äußeren Hülle hat. Jedes Radikal reagiert mit einer hohen Wahrscheinlichkeit mit Nicht-Radikalen unter Bildung von neuen freien Radikalen, eine Kettenreaktion nimmt seinen Lauf. Die Reduktion von Sauerstoff kann zwei freie Radikale bilden: Superoxid-Radikal und Hydroxyl-Radikal. Superoxid-Radikal ist in Wasser ein schwaches Oxidanz, zum Beispiel kann es Vit C oxidieren



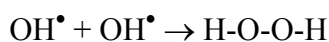
In wässriger Lösung reagiert es häufiger reduzierend, zum Beispiel



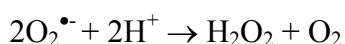
In organischen Lösungen, wie im Inneren biologischer Membranen, ist das Superoxid-Radikal weit reaktiver und demzufolge gefährlicher.

Hydroxyl-Radikal ist das reaktivste bekannte Sauerstoff-Radikal. Es kann sich in biologische Membranen einfügen, sich aber durch Entzug eines Wasserstoffatoms der Membran auch in Wasser zurückwandeln (so geschieht es in der Lipidperoxidation).

Zwei Hydroxyl-Radikale können durch Binden ihrer ungepaarten Elektronen Wasserstoffperoxid bilden.



Auch Superoxid-Radikale können Wasserstoffperoxid bilden.

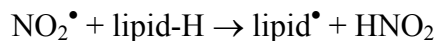
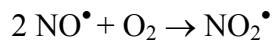


Zwar ist Wasserstoffperoxid kein freies Radikal, stellt aber durch seine Diffusionsfähigkeit durch Membranen und seine Wandlung durch ein Elektron zum

Hydroxyl-Radikal eine mobile Zeitbombe dar. Die Quelle solcher Elektronen können bestimmte Metalle sein, wie schon 1890 von Fenton beschrieben.



Stickstoffmonoxid ist im Organismus unverzichtbar, kann jedoch bei übermäßiger Bildung mit Sauerstoff reagieren und Stickstoffdioxid bilden. Stickstoffdioxid kann Wasserstoffatome aus Membranlipiden ziehen und somit die Lipidperoxidation in Gang setzen.



Soweit ist noch nicht die kausale Verbindung zwischen Alzheimer'scher Erkrankung und oxidativem Stress gezogen. Die Annahme wird durch folgende Überlegungen untermauert. Im AD-Hirn herrscht ein Mikroumfeld mit erhöhten Mengen an Eisen, Aluminium und Quecksilber, die allesamt die Bildung freier Radikale stimulieren können. Man findet erhöhte Lipidperoxidation, erniedrigte mehrfach ungesättigte Fettsäuren, erhöhte 4-Hydroxynonenal im Liquor, was ein Hauptprodukt der Lipidperoxidation ist, weiterhin eine erhöhte Protein- und DNA-Oxidation. Man findet advanced glycation end products, Malondialdehyd, Carbonylsäuren, Peroxynitrit, Häm-Oxygenase-1 und SOD-1. Der Energiemetabolismus und die Cyclooxygenase-Aktivität sind erniedrigt. Aggregiertem β -Amyloid, welches in AD-Hirnen vorhanden ist, ist in der Lage, freie Radikale zu bilden [Markesbury et al. 1997].

Nun im Einzelnen verschiedene Ereignisse, die in erhöhten oxidativen Stress einspielen.

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'sche 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 Kupfer-speichernde Protein. In fünf Hirnregionen, vor allem dem Hippocampus findet man erniedrigte Kupferkonzentrationen bei AD-Patienten [Deibel et al. 1997]. Das APP-Molekül enthält eine Kupfer-bindende Region, durch die Bindung von Kupfer wird das Molekül verändert. Kupfer katalysiert die Bildung von ROS. Außerdem ist Kupfer für verschiedene enzymatische Vorgänge, wie die Cytochrom-C-Oxidase, unentbehrlich.

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

Auch Aluminiumkonzentrationen sind in Alzheimer-Gehirnen erhöht, das Metall sammelt sich in Neuronen an, die Neurofibrillen enthalten [Good et al 1991]. Es wird als kausaler Faktor vorgeschlagen.

Auch Zink wird wie Kupfer von APP gebunden, was dieses funktionell verändert. Es spielt möglicherweise eine Vermittlerrolle bei neuronalem Zelltod.

Neben den Metallen in ihrer redox-aktiven Form sind weitere Faktoren genannt, die zur Bildung freier Radikale beitragen. Dazu gehören Abnormalitäten im mitochondrialen Genom, Amyloid β , advanced glycation end products und aktivierte Mikroglia [Smith et al. 2000].

Neurodegenerative Prozesse und Alterungsvorgänge allgemein werden durch Veränderungen auf mitochondrialer Ebene beeinflusst. In der Elektronenkette, über die Sauerstoff zu Wasser reduziert wird und dabei ATP als Energieträger gewonnen wird, liegt die Aufmerksamkeit vor allem auf dem Enzymkomplex IV, der Cytochrom-C-Oxidase. Eine Beeinträchtigung ihrer Funktion könnte Elektronen von ihrem normalen Weg zu einer Reaktion mit molekularem Sauerstoff fehlleiten und eine vermehrte Bildung von Superoxid-Radikalen bewirken. Zwar wurden in AD-Patienten normale Mengen des Enzyms gefunden, jedoch mit beeinträchtigter Aktivität [Parker and Parks 1995]. Eine andere Gruppe fand

eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien im Zellsoma AD-betroffener Neuronen [Smith et al. 1999].

Mitochondriale Defekte setzen zwei schädliche Prozesse in Gang, zum einen die Bildung freier Radikale, zum anderen eine Verringerung der Energievorräte. Studien konnten verringerte Glucosekonzentrationen messen, die regional mit der Schwere der Alzheimer-Erkrankung korrelierten. Möglicherweise zieht der geringere Energiebedarf durch neuronalen Schaden eine Herabregulierung der Cytochrom-C-Oxidase nach sich, was man als geringeren Glucoseverbrauch messen kann [Rapoport, 1996]. Im Gegensatz zu anderen Hypothesen sind hierin die freien Radikale nicht kausal verantwortlich, sondern Konsequenz des Geschehens.

Für β -Amyloid konnte ein direkt toxischer Effekt in vitro nachgewiesen werden. Zum einen können oxidative Prozesse zur Umwandlung nicht-aggregierten β -Amyloids in aggregiertes anstoßen, zum anderen stellt β -Amyloid selbst eine Quelle freier Radikale dar. Es ist in Vorgänge verwickelt, die einem Entzündungsprozess ähneln (vor allem in der Mikroglia).

Advanced glycation end products (AGE's), die aus heterogenen Proteinaggregaten zusammengesetzt sind und die irreversibel über „cross-linked“ Bindungen verknüpft sind, entstehen über eine Kaskade von Glycilyierungsprozessen. Den Anfang bildet ein nicht-enzymatischer Prozess, so beschrieben 1912 von Maillard. Die Keton- oder Aldehydgruppe eines Zuckers kondensiert spontan mit einer freien Aminosäure unter Bildung einer labilen Schiff-Base. Solche AGE's werden in Verbindung mit β -Amyloid und Tau-Protein gesehen, der Rezeptor für AGE's (sogenannter RAGE) ist ebenfalls ein β -Amyloid-Rezeptor, worüber der Zusammenhang mit AD geknüpft wird. RAGE in Verbindung mit AGE's kann oxidativen Stress verursachen.

Der Körper hat Mechanismen entwickelt, um oxidativem Stress zu begegnen. Es wird vermutet, dass für oxidativen Stress anfällige Neuronen – bevor die auf Antioxidantien zurückgreifen – eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen in Gang setzen. Hierzu stehen Proteine, Metalle und Zellorganellen in einem komplexen Zusammenspiel bereit. Oxidativer Stress setzt Signalketten in Gang, die über eine Aktivierung eines nukleären Transkriptionsfaktors (NF- κ B) zur ver-

mehrten Bildung von schützenden Faktoren führen, dazu gehören antioxidative Enzyme. Diese Antioxidantien wiederum blockieren die Aktivierung von NF- κ B.

Abschließend sei die Verbindung zu normalen Alterungsprozessen gezogen.

Die „Freie Radikal-Hypothese des Alterns“ [Hartmann, 1995] postuliert, dass aus der altersgemäßen Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies eine Schädigung der Hauptbestandteile der Zellen - wie Zellkern, mitochondriale DNA, Membranen und zytoplasmatische Proteine - resultiert. Freie Radikale führen zu Schäden, deren Folgeprodukte akkumulieren. Das bringt das Alter eines Menschen als Risikofaktor deutlich zum Tragen. Wie an anderer Stelle schon gesagt, unterstützt das die Hypothese, dass die Alzheimer'sche Erkrankung nur eine zeitlich akzelerierte Variante des physiologischen Alterns ist. Der akzelerierende Faktor sind demnach alle in diesem Kapitel genannten Faktoren, die oxidativen Stress verursachen oder verstärken.

2.4 Antioxidantien

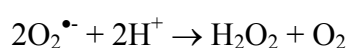
Ein Antioxidanz ist definiert als jede Substanz, die in niedrigen Konzentrationen – im Vergleich zu denen eines oxidierbaren Substrates – die Oxidation dieses Substrats signifikant verzögert oder verhindert.

Sie verwenden dazu folgende Mechanismen:

- Einfangen der von Sauerstoff stammenden Spezies durch Enzyme oder direkte chemische Reaktion
- Minimierung der Bildung solcher Spezies
- Bindung von Metallionen
- Reparatur des Schadens am Zielmolekül
- Zerstörung stark beeinträchtigter Zielmoleküle und Ersatz derer durch neue.

Antioxidantien müssen zum einen die Zelloberfläche vor Sauerstoffabkömmlingen aus der wässrigen Phase, zum anderen die Lipid-Phase schützen. In erster Linie stehen endogene Antioxidantien, die wichtigsten sind Enzyme.

Superoxid-Dismutase beschleunigt die Reaktion



um 10.000-mal. Des weiteren spielen Katalase, Peroxidasen und Glutathion-Peroxidasen eine Rolle.

Biologische Abwehr kann als Vorbeugung, Abfangen und Reparatur charakterisiert werden. Die Domäne ketten-brechender Antioxidantien ist das Abfangen [Sies et Stahl 1995].

Verschiedene Studien untersuchten den Gehalt an Antioxidantien in Alzheimer-Patienten, mit der Frage, ob vielleicht ein Scheitern der antioxidativen Mechanismen an der Krankheitsentstehung ursächlich beteiligt sein könnte. Es wurden keine einheitlichen grundlegenden Mängel an der antioxidativen Enzymaktivität gefunden.

2.4.1 Vitamin E

Anfang 1920 wurde erstmals über einen lebenswichtigen Faktor der Nahrung berichtet, damals bei Ratten gefunden, als fünftem gefundenen Stoff dieser Kategorie gab man ihm den Namen Vitamin „E“.

Der Begriff „Vitamin E“ gilt als Sammelbezeichnung für alle natürlichen und synthetischen Tocol- und Tocotrienolderivate, die qualitativ die biologische Aktivität von α -Tocopherol zeigen. α -Tocopherol ist die bedeutendste der acht in der Natur vorkommenden Formen, meist wird es von geringen Mengen anderer Tocopherole begleitet. In der Natur wird Vitamin E nur von Pflanzen synthetisiert. Vitamin E ist in der Gegenwart von Sauerstoff stabil gegen Hitze, Alkalien und Säuren. Die Oxidation an der Luft erfolgt langsam, hingegen beschleunigen Licht, Hitze, Alkalien und Eisen- und Kupfersalze die Oxidation.

Nach wie vor gibt es noch Unklarheit über die Wirkmechanismen, auch Mangelkrankheiten bei Erwachsenen waren lange Zeit unbekannt. Heute weiß man, dass sie als Folge von Fettmalabsorption und Störungen der Galle- und Pankreassekretion auftreten können, die Avitaminose E kommt auch bei Frühgeborenen und Kindern vor.

Quellen von Vitamin E in der Nahrung sind pflanzliches Öl (vor allem Sonnenblumenöl, Weizenkeimöl und Olivenöl, einschließlich Salatöl und Margarine), Nüsse und ganze Körner. Als allgemeiner Merksatz kann gelten, dass langsam

wachsende beziehungsweise dunkelgrüne Pflanzenteile hohe Tocopherolgehalte haben.

Vitamin E in der Nahrung wird langsam oxidiert, beschleunigt wird dieser Prozess durch Erhitzen und Licht. Schonendes Dünsten und Kochen ist mit geringeren Verlusten verbunden als Backen, Braten und Grillen.

Das mit der Nahrung aufgenommene Vitamin E wird gemeinsam mit den Fetten im Dünndarm resorbiert. Dafür sind Gallen- und Pankreasfunktion von Bedeutung. Vitamin E wird im Intestinum nicht vollständig absorbiert (mindestens die Hälfte geht verloren). Tocopherole werden in der Darmmucosa hydrolysiert. Die Leber ist an der Diskriminierung zwischen α - und γ -Tocopherol beteiligt. Dazu dient ein sogenanntes α -Tocopherol-bindendes Protein (TBP), es bindet vorzugsweise an α -Tocopherol, weniger an γ -Tocopherol. Nachdem Vitamin E in Chylomikronen und intestinalen VLDL inkorporiert wurde, wird der größte Teil über das Lymphsystem abtransportiert. Ein kleiner Teil kann über die Pfortader abtransportiert werden. Patienten mit einer genetisch bedingten Abetalipoproteinämie entwickeln einen Vit E-Mangel, weil sie keine apoB-enhaltenden Chylomikronen synthetisieren können, und keine apoB-enhaltenden Lipoproteine mit Vitamin E aus der Leber entlassen werden. Auch Patienten mit ethyltoxischen Lebererkrankung und mit Hämochromatose weisen etwas verminderte α -Tocopherol-Konzentrationen im Plasma auf.

Im Blut findet ein rascher Austausch von Vitamin E zwischen den verschiedenen Lipoproteinen und Blutzellen statt. Die Halbwertszeit für spontanen Transfer zwischen zwei Lipoproteinen liegt bei 20 bis 70 min. Zwischen 45 und 65 % des α -Tocopherol befinden sich im Plasma, ein weiterer Teil (35-55%) in Erythrozyten und je unter 1% in Thrombozyten und Leukozyten. Im Plasma befindet sich das α -Tocopherol ausschließlich in Lipoproteinen. Im peripheren Gewebe gelangt das Vitamin E bei der Spaltung der in Chylomikronen und VLDL enthaltenen Triglyceride gemeinsam mit den freien Fettsäuren und Monoglyceriden in die Zellen. Vitamin E, welches in LDL transportiert wird, kann auch über rezeptorvermittelte Endozytose des LDL von der Zelle aufgenommen werden.

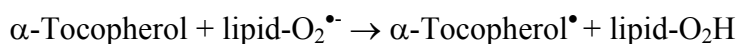
Es gibt im menschlichen Körper kein Organ, welches als Speicherorgan für Vitamin E agiert. Der Hauptweg der Eliminierung von Vitamin E ist die fäkale Ausscheidung, nur weniger als 1% werden im Urin ausgeschieden.

Hoden und Gehirn enthalten weniger α -Tocopherol als die meisten anderen Gewebe, was zu den Hauptzeichen eines Vitamin E-Mangels führen könnte, nämlich reproduktive Störungen und neurologische Fehlfunktion [Bjørneboe et al. 1989].

Faktoren, die den Vitamin E- Gehalt verwirren, sind Alter, Geschlecht, Plasmalipide, Lipid-senkende Medikamente und Rauchen. Außerdem sind viele Krankheiten mit Änderungen im Vitamin E-Status vergesellschaftet und es ist schwierig, festzustellen, ob diese Veränderungen Ursache oder Konsequenz der Krankheit sind. Es wurde eine tägliche Zufuhr von 15-30 mg α -Tocopherol empfohlen, um den Plasmaspiegel konstant zu halten [Traber et Sies 1996]. Dies ist eine Menge, die durch bewusstes Bemühen auch über ausschließliche Nahrungszunahme erreicht werden kann.

Membranen enthalten nur geringe Mengen an Tocopherolen. In der Regel liegt ein Verhältnis von nur einem Tocopherol-Protein je tausend mehrfach ungesättigten Fettsäure-Seitenketten vor. In anderen Worten, im Plasma eines nicht-suplementierten Menschen, entfallen etwa 3 bis 15 α -Tocopherol-Moleküle auf ein LDL-Partikel.

Vit E stabilisiert die Membran, erniedrigt die Membran-Fluidität, reguliert den Phospholipidmechanismus und kontrolliert verschiedene enzymatische Vorgänge. Die effektivste Form in Membranen ist d- α -Tocopherol. Sein Schutz besteht in einem schnellen Einfangen der Lipid-Peroxy-Radikale, schneller als deren Reaktion mit angrenzenden Seitenketten von Fettsäuren stattfindet.



Es fängt die Sauerstoff-Radikale ein, indem es ihnen das aktive Phenol-Wasserstoff-Atom in der Position 6 gibt. Das entstandene α -Tocopherol-Radikal kann mit einem weiteren Radikal reagieren, womit ein Molekül α -Tocopherol zwei Radikale beseitigt hat. α -Tocopherol ist an oder in Nähe der Zellmembran lokalisiert. Die Effizienz des Radikalfangs wird schwächer, je tiefer das Radikal ins Innere der Membran vordringt [Niki et al. 1995].

In isolierten LDL kann α -Tocopherol pro- und antioxidativ wirken. Die antioxidative Leistung wird unter stark oxidativen Umständen erwartet, unabhängig der Anwesenheit von Co-Antioxidantien. Dieser Vorgang kann sich in prooxidative Leistung von α -Tocopherol umwandeln. Diese Bedingungen sind gegeben, wenn die Co-Antioxidantien unter milden oxidativen Umständen verringert oder verbraucht sind. Während starker oxidativer Vorgänge (es werden freie Radikale in einer relativ hohen Rate produziert) findet die klassische antioxidative Gleichung Anwendung, das heißt, mithilfe eines Moleküls α -Tocopherol werden zwei Radikale inaktiviert. Unter milden oxidativen Bedingungen besteht die Gefahr, dass das bei der ersten Inaktivierung eines Radikals gebildete Tocopheroxyl-Radikal für einen Moment auf kein weiteres freies Radikal stößt, und so seine antioxidative Fähigkeit umkehrt und direkt eine mehrfach ungesättigte Fettsäure angreift. Trotz allem scheint die antioxidative Leistung von α -Tocopherol seine hauptsächliche in Plasma und Plasma-Lipoproteinen in vivo zu sein [Konush et al. 1996].

Ein zweiter prooxidativer Mechanismus ist die Reduktion von Übergangsmetall-Ionen in einen hoch aktiven niedrigen Valenz-Zustand.

Neben seiner antioxidativen Funktion kann α -Tocopherol die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress durch Modulation der Signalübermittlung beeinflussen. Einerseits konnte in Zellkultur-Experimenten gezeigt werden, dass α -Tocopherol das Zellwachstum wieder in Gang bringen kann, welches durch die Lipidperoxidation gestoppt war. Andererseits kann α -Tocopherol die Protein-C-Kinase inhibieren, welche das Zellwachstum reguliert. Weiterhin reduziert Vitamin E die Prostaglandin-Bildung in Zellen des Immunsystems und verbessert die zellvermittelte Immunität.

Vitamin E kann in vitro bestimmte Arten des Zelltodes verhindern. Ein Fragment des β -Amyloids wirkt Glutamat-vermittelt zytotoxisch [Behl et al. 1992]. Die vorbeugende Wirkung von Vitamin E auf A β -vermittelte Neurodegeneration wurde nicht von allen Gruppen so beobachtet [Lockhart et al. 1994].

2.4.2 Vitamin C

Vitamin C ist der Gattungsname für L-Zhreo-hex-2-enono-lacton, beziehungsweise L-[+]-Ascorbinsäure und deren Derivate. Primaten, zu denen der Mensch zählt, können L-Ascorbinsäure nicht selbst herstellen. In Pflanzen schützt Chlorophyll Ascorbinsäure vor Oxidation. In alkalischer Lösung geschieht die Oxidation wesentlich schneller als in saurer. Synthetisch hergestellte Analoga werden in der Lebensmittelindustrie zur Konservierung von Speisen zugesetzt.

Die Resorption von Ascorbinsäure beginnt bei oraler Aufnahme schon in der Mundschleimhaut. Die Hauptresorption jedoch findet im Jejunum und Ileum statt. Die Aufnahme geschieht mittels eines Natrium-abhängigen aktiven Transports, bei höheren Konzentrationen auch durch passive Diffusion. Sehr hohe Konzentrationen können über eine Wassersekretion ins Darmlumen gelegentlich eine Diarrhoe hervorrufen. Nichtraucher resorbieren bei einer oralen Aufnahme mehr als Raucher. Gehirn, Rückenmark und Nebennieren weisen die höchsten Ascorbinsäurekonzentrationen des Körpers auf.

Im Plasma ist Ascorbinsäure zu etwa einem Viertel an Eiweiß gebunden.

Bei täglicher Einnahme von weniger als 1-3 g Vitamin C findet die Hauptausscheidung über den Urin statt. Bei höheren Dosen wird zunehmend Vitamin C ohne Metabolisierung in die Fäzes ausgeschieden.

In den Nierentubuli wird Ascorbinsäure bis zu einer Schwellendosis von 8-9 mg/l von einem Natrium-abhängigen Transport zurückresorbiert. Die Eliminationshalbwertszeit hängt von Applikationsart, zugeführter Menge und Resorptionsgeschwindigkeit ab. Regelmäßige Einnahme großer Mengen an Vitamin C kann zu Magenirritation mit Diarrhoe und Urinansäuerung führen. Saurer Urin und Oxalsäure als ein Endprodukt von Dehydroascorbinsäure erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Steinbildung.

Der Vitamin C-Bedarf ist im Seniorenalter schlechter gedeckt als in jüngeren Jahren. Männer zeigten bei Untersuchungen, dass ältere Männer bei gleicher Vitaminversorgung signifikant niedrigere Vitamin C-Plasmaspiegel aufwiesen als jüngere Männer, bei Frauen wurde diese Beobachtung nicht gemacht. Noch gravierender ist dieser Unterschied bei Rauchern, da sind die Plasmaspiegel älterer

Raucher circa 50% reduziert gegenüber jüngeren Rauchern [VERA-Studie, He-seker et al. 1992; BEST-Studie, Volkert et al. 1992].

Die RDA (U.S. recommended daily allowance) für Vitamin C basiert noch heute ausschließlich auf seiner Bedeutung für die Kollagensynthese, sprich der Skor-but-Vermeidung.

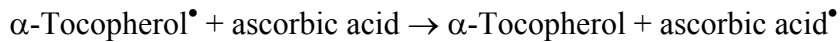
Ascorbinsäure ist im Körper an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt:

- Mitwirkung an der Kollagenbiosynthese (AS-abhängige Hydroxylierung von Prolin und Lysin),
- Begünstigung der Entwicklung und Reifung des Knorpels,
- möglicherweise Hydroxylierung von Steroiden,
- Biosynthese von Carnitin (benötigt zur Einschleusung langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien),
- Beteiligung an Biosynthese von Neurotransmittern (Dopamin zu Noradrenalin),
- über eine Amidierungsreaktion Beteiligung an Entfaltung der biologischen Aktivität neuroendokriner Hormone,
- Schutzfunktion im Tyrosinstoffwechsel,
- Überführung von Folsäure in Tetrahydrofolsäure,
- Cofaktor bei Entgiftung toxischer Metaboliten und Medikamente,
- Verhinderung der Nitrosaminbildung beim physiologischen pH des Magens,
- Steigerung enteraler Eisenresorption durch Schwächung der Ligandenbindung,
- bei Diabetikern kompetitive Hemmung der Glykosylierung von Proteinen,
- Stimulation der körpereigenen Abwehr durch Schutz der Phagozytenmembran vor oxidativer Selbstzerstörung,
- Verminderung des Kataraktrisiko durch Neutralisierung der mit dem Sonnenlicht anfallenden Radikale,
- möglicherweise protektiver Faktor in Karzinogenese ($\frac{3}{4}$ der epidemiologischen Studien finden positives Ergebnis) und
- Antioxidationsschutz.

Studien erkannten einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen Blutdruck und Vitamin C-Aufnahme. Endotheliale Funktion, Hämostase und

Glucose-Homöostase verbessern sich mit erhöhten Vitamin C-Werten [Benzie 1999].

In dieser Studie beschäftigen wir uns vornehmlich mit der antioxidativen Funktion von Vitamin C. Zur Regenerierung von α -Tocopherol wird am stärksten Ascorbinsäure vermutet.



Ascorbinsäure ist ein wasserlösliches Vitamin, kann also nicht an den Ort von α -Tocopherol gelangen. Möglicherweise kann das Tocopherol-Radikal sehr nah an die Membranoberfläche vordringen (ist in der Membran verankert), um von Ascorbinsäure außerhalb der Membran reduziert zu werden (ist im wässrigen Milieu des Zytosols vorhanden).

Das entstandene Ascorbinsäure-Radikal ist nicht sehr reaktiv. Zwei solcher Radikale bilden Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure. Letzteres ist sehr instabil und geht irreversibel verloren, wenn es nicht ins Innere der Zellen zur Regenerierung gelangt. Netto geht an Orten oxidativer Schädigung Vitamin C verloren. Es wird vermutet, dass auch Ascorbinsäure über das Glutathionsystem mithilfe von NADH oder NADPH regeneriert wird.

Ascorbinsäure kann jedoch auch prooxidativ wirken. Unter Anwesenheit von H_2O_2 beschleunigt es die Bildung von $\text{OH}^{\bullet}$, indem es Fe^{2+} und Cu^+ bildet.

Der Übertritt von Ascorbinsäure aus dem Plasma in den Liquor geschieht hauptsächlich durch aktiven, Natrium-abhängigen, stereospezifischen Transport im plexus choroideus, Nebenwege stellen ein Carrier-vermittelter Transport und einfache Diffusion über Hirnkapillaren an der Blut-Hirn-Schranke in den Liquor dar. Als alternativen Weg benutzt das neutrale Oxidationsprodukt Dehydroascorbinsäure einen Glucose-Transporter. In der extrazellulären Flüssigkeit wird es dynamisch durch einen Glutamat-Ascorbinsäure-Heteroaustausch moduliert. Zur Erhöhung des Ascorbinsäuregehalts wird als erstes dieser Mechanismus beansprucht.

Aus der extrazellulären Flüssigkeit wird es in die Zellen aufgenommen, wo eine bis zu zwanzigfache Konzentrierung stattfindet [Rice 2000].

Hirngewebe weist regionale Unterschiede in der Ascorbinsäurekonzentration auf. Die höchsten Konzentrationen findet man in den anterioren Regionen wie cerebraler Cortex und Hippocampus. In der grauen Substanz mit vielen Neuronen ist Ascorbinsäure stärker konzentriert als in der weißen Substanz. [Rice 1998].

2.4.3 Andere Antioxidantien

Vitamin E und C sind wahrscheinlich die wichtigsten Antioxidantien in Bezug auf die Lipidperoxidation. Der Körper verfügt über ein breites antioxidatives Abwehrsystem. Die intrazelluläre antioxidative Abwehr wird hauptsächlich durch die Enzyme Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase bestritten. Die Neuronen reagieren auf die Schädigung durch oxidative Prozesse in einer Hochregulierung antioxidativer Enzyme, so gezeigt für Häm-Oxygenase-1 und Superoxid-Dismutase. Glutathion ist ein wichtiges Antioxidanz, es kommt in fast allen Zellen in hoher Konzentration vor. Zwei Moleküle der reduzierten Form werden bei der Oxidation vom Disulfid verknüpft.

Die extrazellulären Flüssigkeiten des menschlichen Körpers wie Plasma und Liquor enthalten sehr wenig bis keines dieser Enzyme. Im Plasma übernehmen Coeruloplasmin, Albumin, Transferrin, Hämoglobin und Bilirubin die Hauptaktivität antioxidativer Abwehr. In zweiter Linie der Abwehr stehen die wasserlösliche Harnsäure und Ascorbinsäure und die fettlöslichen Ubichinol-10, Tocopherole und Protein-SH-Gruppen. Liquor enthält nur wenig Transferrin, Albumin und Coeruloplasmin, aber enthält Harnsäure und hohe Konzentrationen von Ascorbinsäure.

Neben seiner wichtigen Rolle im mitochondrialen Elektronentransport agiert Ubichinol (auch Coenzym Q) als lipophiles Antioxidanz.

Es wirkt als Peroxyl-Radikalfänger oder durch Regenerierung von α -Tocopherol ($\text{CoQH}_2 + \text{T}^\bullet \rightarrow \text{CoQH}^\bullet + \text{TH}$) oder über beide Wege. Die Konzentration von Ubichinol ist sehr gering, bis zu 90% der LDL-Partikel enthalten kein Ubichinol. Es scheint, als wäre Ubichinol im Gegensatz zu Vitamin E in der Lage, sowohl die Initiierung als auch die Propagation der Lipidperoxidation zu verhindern, während Vitamin E als „Ketten-brechendes“ Antioxidanz ausschließlich die Propa-

gation verhindert. Ubichinol scheint in einer besonders vorteilhaften Lage zu sein, erstens aufgrund seiner Lage in der hydrophoben Region der Membran-Phospholipid-Doppelschicht (wo diese Prozesse stattfinden), zum zweiten durch seinen Zugang zu Enzymsystemen, die Ubichinol vom Ubisemichinol-Radikal regenerieren können [Ernster et al.1993].

In Studien wurde eine vorteilhafte Wirkung auf die Gedächtnisleistungen schizophrener Patienten und die Führung von Patienten mit Chronischem Erschöpfungssyndrom gezeigt.

Carotenoide sind wichtige Antioxidantien in Pflanzen, für den menschlichen Körper wurde kein solcher Zusammenhang gefunden. Zu den Carotinoiden zählen α -Carotin, β -Carotin, Lycopin und Xanthophylle. Der Plasmagehalt wird von der diätetischen Aufnahme bestimmt. Als lipophile Antioxidantien werden sie von LDL getragen. β -Carotin hat möglicherweise die größte Bedeutung für den Menschen. Anreicherung mit diesen Substanzen scheint jedoch keinen erhöhten Schutz gegenüber oxidativen Prozessen darzustellen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Patienten

13 Patienten der Gedächtnissprechstunde der Psychiatrischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf wurden in die Studie einbezogen. Die Patienten sind in fortwährender ärztlicher Betreuung ebendieser Einrichtung, wobei die Betreuung in der Regel neben einer Eingangsuntersuchung (inklusive einer diagnostischen Lumbalpunktion und einer venösen Blutentnahme) regelmäßige halbjährliche Verlaufsuntersuchungen anhand neuropsychologischer Testungen umfasst.

Die Patienten nehmen täglich 400 mg Vitamin E Ephynal® mittags und je 500 mg Ascorvit® morgens und abends ein.

Anhand der Erstuntersuchung wird eine ApoE-Genotypisierung vorgenommen.

Halbjährlich im Rahmen der Verlaufsuntersuchungen werden neben dem stets stattfindenden Mini-Mental-Status-Test gelegentlich auch andere Instrumente verwendet, wie das Nürnberger Altersinventar (NAI), der Uhren-Test nach Shulman und die Rey-Osterrieth-Figur.

In die Studie flossen lediglich Mini-Mental-Status-Test-Werte des Zeitpunkts der Beginn und des Endes der Studie ein.

Die Diagnose „Demenz vom Alzheimer-Typ“ ist klinisch anhand der Kriterien des NINCDS-ADRDA (National Institute of neurological and communicative disorders and stroke and the Alzheimer's disease and related disorders association), der DMS-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, vierte Ausgabe) und der ICD-10 (Internationale Klassifikation psychischer Störungen, 10. Revision) gestellt.

Neben dem Alter der Patienten zu Beginn der Studie ist vor allem deren Alter bei Erstdiagnose der Alzheimer'schen Erkrankung von Relevanz.

Bezüglich Nebenerkrankungen wurden Angaben über Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit, arterieller Hypertension und eines Diabetes mellitus ge-

macht. Die Patienten nehmen als Medikation Aricept[®], keiner der Patienten nimmt Nicht-Steroidale Antiphlogistika und Östrogene ein.

Es wurden Angaben über Gewicht und Größe der Patienten notiert, die in den Body mass index einfließen.

Schließlich wurden die Patienten zu ihren Rauchgewohnheiten befragt.

Vor Beginn der Studie wurden die Patienten, gegebenenfalls in Begleitung ihrer Betreuungsperson, über den Ablauf der Studie aufgeklärt und über die drei in diesem Rahmen vorgesehenen Lumbal- und venösen Punktionen in Kenntnis gesetzt. Ihre Zustimmung und Einverständnis gaben sie schriftlich mit einer Unterschrift.

Persönliche Daten wurden und werden vertraulich behandelt.

Die Studie ist durch die Ethikkommission der Universität Hamburg genehmigt.

3.1.2 Untersuchungsmaterial, deren Gewinnung und Aufbereitung

Die Patienten wurden eigens zu einer den Vereinbarungen dieser Studie entsprechendem Zeitpunkt in die Gedächtnissprechstunde der Psychiatrischen Klinik einbestellt. In der gleichen Sitzung fanden eine Lumbalpunktion zur Gewinnung von liquor cerebrospinalis und eine venöse Punktion zur Gewinnung von EDTA-Blut statt.

Die Patienten liegen eine Stunde, bevor die Lumbalpunktion von einem Arzt durchgeführt wird, dazu wird der Durasack des Rückenmarkes zwischen dem 3. und 4. beziehungsweise zwischen dem 4. und 5. Lendenwirbeldornfortsatz punktiert und Liquor entnommen.

Sofort im Anschluss an die Liquorentnahme wurde der Liquor in Eppendorf-Aliquots zu 500 µl portioniert, mit Stickstoff oder Argon begast und bei –80°C eingefroren.

Das venöse Blut wurde auf Eis gelagert innerhalb der darauffolgenden halben Stunde der Weiteraufbereitung zugeführt. Blutplasma wurde durch zehnminütige Zentrifugation bei 2500 rpm und 4°C von den korpuskulären Bestandteilen getrennt. Das so gewonnene Plasma wurde in 250 µl Eppendorf-Aliquots mit Stickstoff oder Argon begast, zusätzlich mit Parafilm luftdicht verschlossen und

ebenfalls bei -80°C eingefroren. Lediglich 750 μl des Plasmas wurden nicht dieser Verarbeitung zugeführt, sondern zur späteren Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes mit gleicher Menge 10%iger Meta-Phosphorsäure versetzt und in dieser Form unter Stickstoff- oder Argonbegasung bei -80°C eingefroren.

Die Lagerungsdauer der Proben zieht entsprechend der langen Laufzeit der Studie große Schwankungen nach sich. Die ersten Liquor- und Plasmaproben wurden Ende des Jahres 1998 gewonnen. 5 Proben der Studie, die bis Anfang des Jahres 2000 angefallen sind, wurden zu diesem Zeitpunkt spätestens gemessen, was leider nicht mehr genau nachvollziehbar ist. Es liegen zwischen Entnahmezeitpunkt und Messung in diesen Fällen maximal 14 Monate.

Alle danach eingegangenen Proben wurden von mir im zweiten Halbjahr des Jahres 2001 gemessen. Das bedeutet, dass hierbei eine maximale Lagerungsdauer von 18 Monaten vorliegt.

Das führt zu zwei Überlegungen, an die ich an späterer Stelle weiter eingehen möchte: Proben zu 5 Zeitpunkten wurden zum großen Teil von anderen Personen gemessen, was einen methodischen Fehler nicht ausschließt. Zum zweiten schwankt die Lagerungsdauer vor der Messung zwischen 18 und 0 Monaten.

Unmittelbar vor den Experimenten wurden die Proben gleich behandelt, sie wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Somit wurde versucht, unerwünschte unspezifische Oxidierungsvorgänge und damit die Verfälschung der Messergebnisse so gering wie möglich zu halten.

3.1.3 Geräte

- Gaschromatisches System (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA):
 GC-FID (Gas Chromatograph with Flame Ionisation Detection)
 Gaschromatograph Hewlett-Packard 5890 Series II
 Gaschromatographische Säule HP-5MS
 HP Series 3365 II Chemstation, Version A.0334
- HPLC-System (High Performance Liquid Chromatography)
 Agilent ChemStation for LC and LC/ MS systems (Agilent Technologies)
- Photometer mit Küvettenwechsler (Perkin-Elmer-Corporation, Norwalk, USA)

Software UV-Winlab Lambda 2-40, Version 2.85

- Spektralphotometer Modell 150-20 (Hitachi, Japan)
- Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Instruments)
- Laborzentrifuge Heraeus Sepatech MinifugeT (Kendro Laboratory Products)

3.1.4 Chemikalien, Verbrauchsmaterial

- Heptadekansäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- 5 α -Cholestan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Butylhydroxytoluol
- Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Toluol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- n-Hexan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Dimethylformamid (DMFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Natriummethylat 0,5 M Lösung in Methanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Acetylchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2-Propanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Lithiumperchlorat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- α -, δ -, γ -Tocopherol (Fluka, Buchs, Schweiz)
- β -Cryptoxanthin, α -Carotin (Chemos GmbH, Deutschland)

- β -Carotin, Ubichinon 7, Ubichinon 9, Ubichinon 10 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Lycopin (ICN)
- L(+)-Ascorbinsäure krist. reinst. (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- tri-Natriumcitratdihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2,6-di-Chlorphenolindophenol (DCIP)
- PBS Dulbecco's w/o calcium and magnesium (Life Technologies, Paisley, GB)
- Chelex 100 Resin (BioRad Laboratories, Hercules, USA)
- 2,2-Azobis(2-amidinopropane)hydrochlorid (Polyscience, Inc., Warrington, USA)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL QS 1.000, Hohlraum 1 cm (Deckelverschluss) beziehungsweise 4 mm (Gewindeverschluss)
- Parafilm (American National Can, Menasha, USA)
- Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Finnpiquette (Labsystems)
- Pyrex-Röhrchen 16x100 (Bibby Sterlin Ltd., Stone, Staffs, England)
- CHOL-PAP Roche / Hitachi 717 zur Cholesterin-Bestimmung im Plasma
- GPO-PAP Roche / Hitachi 902 zur Triglycerid-Bestimmung im Plasma

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung von Plasma- und Liquorlipiden

Im Plasma werden Fettsäuren, im Liquor zusätzlich Cholesterin, mithilfe der Gaschromatographie mit einem Flammenionisationsdetektor gemessen. Dies findet unter hohen Temperaturen statt und erfordert eine entsprechende Aufbereitung des Untersuchungsmaterials.

Um die Gesamtfettsäuren messen zu können, müssen die Fettsäuren von den Lipiden abgespalten werden [Folch et al. 1957].

Die Bestimmung des Cholesterins aus der gleichen Probe erfordert für den Liquor einen zusätzlichen Schritt.

Im Plasma:

Es werden zur Durchführung, wenn nicht anders aufgeführt, Pyrex-Röhrchen aus Glas benutzt, die mit einem Schraubdeckel dicht verschlossen werden können. Die einzelnen Arbeitsschritte finden alle unter dem Abzug statt.

100 µl Heptadekansäure (200 mg/l im Ethanol) wird als interner Standard vorgelegt, das dient zur späteren Berechnung der Fettsäuren. 25 µl Butylhydroxytoluol (0,1 M im Ethanol) vermindert als Antioxidans die Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Nach Zugabe von 100 µl Plasmaprobe wird der Ansatz mit 2 ml eines Methanol/ Toluol-Gemisches (4:1 v/v) versetzt.

Zur Hydrolyse wird beim Vortex langsam 200 µl Acetylchlorid hinzugegeben. Gut verschlossen wird der Ansatz 60 min bei 80°C im Trockenschrank inkubiert.

Nachdem der Ansatz wenige Minuten bei Raumtemperatur abkühlte, wird eine starke Base zum Stoppen der Reaktion und Heben des pH-Wertes auf normale Werte zugesetzt. Dazu verwendet man 5 ml einer 6%-igen wässrigen Natriumcarbonatlösung. Wieder gut verschlossen, wird der Ansatz 30 s auf dem Vortex gemischt und anschließend 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Es findet eine Phasentrennung statt. 250 µl aus der oberen Toluolphase werden in ein Eppendorfer-Röhrchen pipettiert. Nach Abdampfen des Toluol unter Stickstoff wird der Niederschlag in 20 µl des Laufmittels aufgenommen.

Zur quantitativen Bestimmung der Fettsäuren wird 1 µl der aufbereiteten Probe in den Gaschromatographen eingespritzt.

Im Liquor:

In Ergänzung zur Fettsäurebestimmung im Plasma wird für die Aufbereitung des Liquors ein weiterer interner Standard verwendet.

25 µl Heptadekansäure, 25 µl 5α-Cholestanlösung (100 mg/l im Ethanol) und wiederum 25 µl Butylhydroxytoluol als Antioxidans werden im Pyrex-Röhrchen

vorgelegt. Nach Zugabe von 300 µl Liquorprobe wird der Ansatz mit 1200 µl Chloroform/ Methanol-Gemisch versetzt (2:1 v/v). Damit die Lipide in die organische Phase übergehen können, wird der Ansatz eine Minute auf dem Vortex gemischt. Zur Phasentrennung schließt sich eine zehnminütige Zentrifugation bei 3000 U/min und 4°C an.

In ein sauberes Pyrexröhrchen wird 650 µl aus der unteren Chloroformphase pipettiert. Das Lösungsmittel Chloroform wird unter Stickstoff abgedampft.

Der gewonnene Rückstand wird in 250 µl Toluol aufgenommen, mit 500 µl Natriummethoxid (0,5 M) gemischt und mit Stickstoff begast, bevor der Ansatz bei 50°C für 15 min im Trockenschrank inkubiert wird.

Im Anschluss dient 1 ml 2,5%iger Essigsäure zur Neutralisierung. Mit 250 µl Hexan versetzt wird die Lösung erneut eine Minute auf dem Vortex gemischt. Nach der Zentrifugation bei 3000 U/min und 4°C 10 min lang, wird aus der oberen Hexanphase 200 µl in ein Eppendorfer-Röhrchen pipettiert und das Lösungsmittel unter Stickstoff abgedampft.

Als letzter Schritt schließt sich die Silylierung an. Dazu wird der gewonnene Niederschlag in 100 µl Dimethylformamid aufgenommen und mit 100 µl N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid versetzt. Dieser Ansatz wird bei Raumtemperatur 60 min unter Stickstoff inkubiert. Letztendlich wird unter Stickstoff die Reaktionslösung abgedampft und der Niederschlag in 20 µl des Laufmittels Toluol aufgenommen.

Zur quantitativen Bestimmung sowohl der Fettsäuren als auch des Cholesterins werden 2 µl der aufbereiteten Probe in den Gaschromatographen eingespritzt.

Messung:

Im Gaschromatographen dient Helium als mobile Phase, mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,48 ml/min. Die Auftrennung erfolgt über eine HP-5-MS-Säule von einer Länge von 30 m. Die Temperatur des Injektionsblocks beträgt 250°C, die des Detektorblocks 300°C. Die Geamtlaufzeit beträgt pro Probe 30 min.

Da im ersten Schritt der Probenaufbereitung von Plasma und Liquor ein, beziehungsweise zwei interne Standards vorgelegt wurden, können diese nun zur quantitativen Bestimmung der in der Probe vorhandenen Fettsäuren und Choles-

terins herangezogen werden. Da sie die gleiche Aufbereitung wie die Probe erfahren haben, ist deren messbarer Verlust dem der in der Probe vorhandenen gleichzusetzen.

Im Plasma wurden verschiedenste Fettsäuren gemessen. Der Gehalt an Gesamtfettsäuren (TFA, total fatty acids) berechnet sich als Summe aus gesättigten Fettsäuren (SFA, saturated fatty acids), einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA, monounsaturated fatty acids) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA, polyunsaturated fatty acids).

Gesättigte Fettsäuren sind die Summe aus Myristensäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Arachidinsäure (20:0) und Beheninsäure (22:0).

Es wurden 6 verschiedene einfach ungesättigte Fettsäuren und 12 mehrfach ungesättigte Fettsäuren gemessen.

Im Liquor wird Cholesterin gemessen.

Die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0), die einfach ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (18:1, n-9) und Vaccensäure (18:1, n-7) und die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolensäure (18:2, n-6) und Arachidonsäure (20:4, n-6) werden zum Bestimmen des Gehaltes an Gesamtfettsäuren herangezogen.

3.2.2 Bestimmung der lipophilen Antioxidantien

Im Plasma und Liquor werden wesentliche lipidlösliche Antioxidantien mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) aufgetrennt [Finck et al. 1999]. Anhand ihrer charakteristischen Retentionszeiten werden sie mithilfe spezieller Software identifiziert. Zur quantitativen Bestimmung dienen sowohl interne Standards im Falle der Plasamessungen als auch externe Standards. Zur Kalibrierung werden entsprechende Eichreihen für Plasma und Liquor hergestellt und in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Standards sind im Ethanol gelöst und werden lichtdicht versiegelt bei -20°C aufbewahrt.

Als Laufmittel dient ein Gemisch aus Methanol, Ethanol und 2-Propanol im Verhältnis 18:5:2 (v/v), auf einen Liter Laufmittelgemisch werden 1,425 g Lithiumperchlorat gelöst.

Im Plasma:

In einem Eppendorfer-Röhrchen werden 30 µl δ -Tocopherol (30 µM im Ethanol) als interner Standard für die verschiedenen Tocopherole, 30 µl Ubichinon-7 (3 µM im Ethanol) als interner Standard für Ubichinon-10 und 40 µl Ubichinol-9 (4 µM im Ethanol) als interner Standard für Ubichinol-10 vorgelegt, dazu werden 100 µl Plasma pipettiert. Dieser Ansatz wird mit 500 µl Hexan versetzt und eine Minute auf dem Vortex durchmischt. Zur Phasentrennung wird das Röhrchen 3 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert.

Aus der oberen Hexanphase werden 400 µl in ein Eppendorfer-Röhrchen abgenommen, das Lösungsmittel wird unter Stickstoff abgedampft.

Der gewonnene Niederschlag wird in 1 ml des Laufmittels Ethanol aufgenommen.

150 µl davon werden in die HPLC-Anlage eingespritzt.

Im Liquor:

150 µl Liquorprobe wird mit 150 µl Ethanol und 750 µl Hexan versetzt. Dieser Ansatz wird eine Minute auf dem Vortex durchmischt und im Anschluss daran 3 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert.

Aus der oberen Hexanphase werden 600 µl in ein Eppendorfer-Röhrchen pipettiert. Das Lösungsmittel wird unter Stickstoff abgedampft und der gewonnene Niederschlag in 200 µl des Laufmittels Ethanol aufgenommen.

Der aufbereiteten Plasmaprobe vergleichbar werden 150 µl davon in die HPLC-Anlage eingespritzt.

Messung:

Die Messung wird über eine Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 ml/min vorgenommen. Als mobile Phase wird ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol : Ethanol: iso-Propanol mit einem Zusatz von 13,4 mM Lithiumperchlorat verwendet. Die Detektion bedient sich zweier Zellen, die in einem Reduktions- /Oxidationsmodus arbeiten.

Im Plasma werden γ -Tocopherol, α -Tocopherol, α -Carotin, β -Carotin und Ubichinol-10 als lipophile Antioxidantien gemessen, zusätzlich wird Ubichinon-10

als primäres Oxidationsprodukt von Ubichinol-10 bestimmt. Die Messung einer Plasmaprobe dauert 28 min.

Im Liquor werden α -Tocopherol und γ -Tocopherol gemessen, wobei letzteres in so geringer Menge vorhanden ist, dass es in dieser Studie nicht in Betracht gezogen wurde. Die Messung einer Liquorprobe dauert nur bis zu 8 min, da beide Bestandteile sehr frühe Retentionszeiten aufweisen.

3.2.3 Bestimmung hydrophiler Antioxidantien

Im Plasma und im Liquor wird Ascorbinsäure (Vitamin C) als hydrophiles Antioxidans bestimmt.

Gemessen wird die Reduktion des in konstanter Menge den Proben zugegebenen Farbstoffes 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) im Photometer bei 520 nm Wellenlänge und einem pH-Wert von 3 – 4,5. Diese Reaktion ist Vitamin C-abhängig. Für jede Probe wird nach der Messung ein individueller Probenblindwert bestimmt, indem einige Kristalle Ascorbinsäure dem Ansatz zugegeben werden. Ist der Farbstoff vollständig reduziert, der Ansatz also farblos, wird erneut gemessen.

Es werden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Im Plasma:

Verwendet werden jene Plasmaproben, die unmittelbar nach der Blutentnahme separat der anderen Aliquots zur Vitamin C-Bestimmung wie folgt vorbereitet wurden: 750 μ l Plasma wurden mit 750 μ l 10%iger Metaphosphorsäure in einem Eppendorfer-Röhrchen versetzt, auf dem Vortex durchmischt und 10 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert. 850 μ l des Überstandes wurden unter Argon oder Stickstoff bei –80 °C eingefroren. In einer unabhängigen Versuchsreihe wurde die Plasmaprobe nach dem Lagern bei –80°C aufgetaut und erst dann mit 10%iger Metaphosphorsäure versetzt, gemischt, zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Anschließende Schritte sind identisch.

Für Doppelbestimmungen werden zweimal 400 μ l des Überstandes mit 200 μ l eines Citrat-Acetat-Puffers (CAP; 22 g Trinatriumcitratdihydrat in 40 ml destilliertem Wasser gelöst, mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,15 titriert und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt) versetzt.

Direkt am Photometer werden 200 µl des gelösten Farbstoffes DCIP (0,1 mg/ml im dest. Wasser) dem Ansatz zugegeben, gut auf dem Vortex durchmischt und nach circa 30 s dessen Absorption gemessen.

Im Liquor:

Die Liquorprobe wird erst nach der Lagerung bei –80°C aufbereitet. Dazu werden 300 µl 10%ige Metaphosphorsäure und 300 µl 5%ige Metaphosphorsäure in einem Eppendorfer-Röhrchen vorgelegt und 300 µl der Liquorprobe hinzupipettiert. Der Ansatz wird auf dem Vortex gemischt und 10 min bei 13000 U/min und 4°C zentrifugiert.

Es werden für Doppelbestimmungen zweimal 400 µl Überstand gewonnen, mit denen in gleicher Weise verfahren wird wie mit den Plasmaproben.

Auswertung:

Um über die Absorptionswerte der aufbereiteten Proben die Ascorbinsäurekonzentration ermitteln zu können, wird eine Eichgerade erstellt. Es wird mit 5%iger Metaphosphorsäure eine Eichlösung mit einer Ascorbinsäurekonzentration von 20 µg/ml hergestellt, die in sechs Schritten jeweils im Verhältnis 1:1 verdünnt wird. Von jedem Verdünnungsschritt werden zweimal 400 µl für Doppelwerte in Eppendorfer-Röhrchen pipettiert. Der Eichreihe liegt eine Korrektur durch einen dreifach bestimmten Reagenzienblindwertes aus reiner 5%iger Metaphosphorsäure zugrunde.

Die Eichreihe und der Reagenzienblindwert werden wie die Proben behandelt.

Die Absorption der Probe wird über folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Absorption} = (R_b - R_{bred}) - (P - P_{red})$$

R_b Reagenzienblindwert

R_{bred} Reagenzienblindwert nach Reduktion mit Überschuss an Ascorbinsäure

P Probenwert

P_{red} Probenwert nach Reduktion mit Überschuss an Ascorbinsäure

Mit Hilfe der Eichgeraden (Konzentration gegen Absorption) werden die absoluten Konzentrationen an Ascorbinsäure ermittelt.

3.2.4 Bestimmung der Oxidierbarkeit

Die Oxidierbarkeit wird mithilfe eines Photometers mit Küvettenwechsler gemessen.

Bei der Oxidation von Lipiden entstehen konjugierte Hydroperoxide. Deren Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 234 nm [Esterbauer et al. 1989]. Aus der ermittelten Absorption kann auf die Oxidierbarkeit der Lipoproteine geschlossen werden.

Im Plasma:

Zur Verdünnung der Probe wird PBS (phosphate buffered saline) verwendet. Normalerweise enthält PBS Spuren von Übergangsmetallen. Deshalb wurde es eine Stunde mit 5 mg/100 ml Chelex behandelt und dann filtriert. PBS wird mit 0,1 M Salzsäure auf pH-Wert 7,4 eingestellt.

Für jede Probe werden zwei Ansätze pipettiert, wovon einer die Autooxidation und einer die kontrollierte Oxidation anhand eines chemischen Initiators wieder spiegeln sollen.

Im erster Ansatz werden 20 µl Plasma mit 2980 µl PBS verdünnt. Im zweiten Ansatz werden 20 µl Plasma mit 30 ml 2,2'-Azobis-(2-Amidinopropan) Hydrochlorid (AAPH) (33mM im – mit Chelex behandelten – Wasser) versetzt und mit 2950 µl PBS verdünnt. Als dritter Ansatz wird ein Leerwert mit AAPH pipettiert (30 µl AAPH auf gleiches Volumen wie Ansatz 1 und 2 von 3 ml mit PBS verdünnt). Die starke Verdünnung, hier 150-fach ist notwendig, um eine ausreichend niedrige Absorption für verlässliche Messungen zu erreichen.

Nachdem die Ansätze auf dem Vortex gut durchmischt wurden, werden sie in 3 ml Quarzküvetten überführt, luftdicht mit Parafilm verschlossen und in den auf 37°C temperierten Küvettenwechsler des Photometers gestellt.

Die Messung erfolgt im Minutentakt über 360 Minuten.

Im Liquor:

Für Liquormessungen werden ebenfalls je Probe zwei Ansätze pipettiert, wovon erster auf 100 µl Liquor 900 µl PBS zur Verdünnung enthält. PBS wird wie zur Plasamessung verwendet. Zweiter Ansatz dient wiederum der kontrollierten

Oxidation, wobei auf 100 µl Liquor 100 µl AAPH (1 mM) versetzt und mit 800 µl PBS verdünnt werden.

Nach guter Durchmischung auf dem Vortex werden die Ansätze in englumige Quarzküvetten (4x4 mm innerer Hohlraum) überführt. Um unerwünschten Volumenverlust und somit eine Konzentrierung des Ansatzes zu vermeiden werden die Küvetten mit Gummidichtungen und Gewindedeckel verschlossen und in das Photometer gestellt.

Die Messung erfolgt im Minutentakt über mindestens 20 Stunden.

Auswertung:

Zur Auswertung der Oxidierbarkeit von Plasma werden zunächst mithilfe spezieller Software je Ansatz eine mittlere Rate des Absorptionsanstieges zwischen 50 und 360 min berechnet. Zur Korrektur der durch AAPH verursachten Absorptionsänderung wird der Leerwert vom zweiten Ansatz abgezogen. Somit erhält man je Plasmaprobe einen Wert für die Autooxidationsrate und einen Wert für die AAPH-initiierte Oxidationsrate, die schließlich als nmol konjugierte Diene/l/min dargestellt werden. Sie werden als Maß für die Geschwindigkeit der Oxidierbarkeit von Plasma verwendet.

Zur Auswertung der Oxidierbarkeit von Liquor wird eine spezielle Software verwendet, die die Absorptionswerte als charakteristische Oxidationskurven auftragen kann, die dann wie an anderer Stelle beschrieben anhand ihrer Parameter wie Dauer der Oxidationsphasen und Anstieg der Oxidationskurven ausgewertet werden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Patienten

In die Studie sind 13 Patienten eingeschlossen. Nur 10 der Patienten vollendeten bei Abschluss der Untersuchungen die 12 Monate Vitaminsupplementierung. Im folgenden beziehen sich die Ergebnisse auf diese 10 Patienten, da es im Wesen der Studie liegt, Ergebnisse von der Dauer eines ganzen Jahres zu betrachten. Die Charakterisierung ist aus folgender Tabelle ersichtlich.

	Vitamin E und C-supplementierte Patienten N = 10
Alter	67,2± 8,1
Geschlecht (M/W)	6/4
Body mass index (kg/m ²)	26,5± 3,4
Rauchen (J/N)	0/10
Koronare Herzerkrankung (J/N)	1/9
Arterieller Hypertonus (J/N)	1/9
Diabetes mellitus (J/N)	1/9
Mini Mental Status Examination Score	
Zu Beginn der Studie	19,9± 5,0
Nach Abschluss der Studie	17,7± 8,0
Alter bei Erstdiagnose AD	63,0± 8,1
ApoE4 Allelfrequenz	0,4

Sechs Männer und vier Frauen nahmen an der Studie teil. Das mittlere Alter zu Beginn der Studienteilnahme betrug 67, 2 Jahre, wobei der Jüngste nur 54 Jahre

alt war und der Älteste 77 Jahre. Die große Altersspanne von 23 Jahren ist auffallend, fällt jedoch möglicherweise nicht so stark ins Gewicht wie ehemals angenommen. Unterschiede im Alter zwischen Alzheimer-Patienten wiegen die gleichzeitig beobachteten Gemeinsamkeiten deutlich auf. Außerdem werden in dieser Studie weniger Beobachtungen innerhalb des AD-Kollektives untersucht als vielmehr die Entwicklung der jeweiligen Parameter jedes Einzelnen. Dies ist eine weitere Überlegung, die genannten Altersunterschiede weniger in Betracht zu ziehen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug auf der Grundlage anamnestischer Angaben 63 Jahre. Hier spiegelt sich entsprechend der oben genannten Altersspanne gleiches wider. Die mittlere Krankheitsdauer zwischen Diagnosestellung und Beginn der Teilnahme an der Studie betrug 4,2 Jahre. Ein Patient zeigt einen ungewöhnlich milden Verlauf mit 9 Jahren bisheriger Krankheitsdauer. Sieben Patienten liegen zwischen zwei und vier Jahren Krankheitsdauer.

In der Untersuchung vor der ersten Vitamineinnahme erreichten die Patienten im Schnitt einen Score in der Mini Mental State Examination (MMSE) von $19,9 \pm 5,0$. Nach 12 Monaten bei Ende der Studie wurde erneut getestet, der mittlere Score lag bei $17,7 \pm 8,0$. Eine Patientin begann die Studie mit überdurchschnittlichen niedrigen Testergebnissen (12 Scores), und war zum Ende der Studie nicht mehr messbar, weshalb sie mit 0 Testscores in die Mittelung der Werte eingeht. Ohne diese Patientin betrachtet betragen Beginn- und Endscore der verbleibenden neun Patienten 20,8 und 19,6.

Die Patienten sind alle in einem guten Ernährungszustand, tendenziell übergewichtig. Der mittlere body-mass-index beträgt 26,5 kg/m (Normalgewicht liegt in der Spanne zwischen 18,5 und 24,9 kg/m). Eine Ernährungsmangelsituation, auch in Anbetracht der diätetisch zugeführten Vitamine, kann praktisch ausgeschlossen werden.

Die zusätzlich klinisch und anamnestisch erhobenen Daten bezüglich Rauchgewohnheiten und anderer Erkrankungen wie Arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Koronare Herzkrankheit der ausgewählten AD-Patienten ergeben keine beachtenswerten Informationen über eventuelle zusätzliche Stressfaktoren auf den Körper, regelmäßige Medikamenteneinnahme und mögliche Interferen-

zen. Nur ein Patient ist Raucher und nur je ein Patient hat eine der aufgeführten Erkrankungen.

4.2 Messung der Lipide im Plasma

Routinemäßig wird bei Patienten der Lipidstoffwechsel untersucht.

	vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Cholesterin (mg/dl)	205,70± 30,58	218,40± 36,57	208,90± 34,29	0 vs. 1 M. p= 0,074 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. p= 0,09
Triglyceride (mg/dl)	185,40± 84,98	167,80± 91,73	168,10± 65,27	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
LDL (mg/dl)	124,40± 29,08	139,30± 29,12	126,90± 27,65	0 vs. 1 M. p= 0,03 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. p= 0,06
HDL (mg/dl)	43,50± 9,49	46,10± 11,91	48,30± 19,46	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
VLDL (mg/dl)	36,40± 17,19	33,40± 18,39	33,70± 12,96	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
LDL /HDL	2,86	3,02	2,63	

Der Cholesterinwert steigt nach einem Monat leicht an und fällt bis zum Zeitpunkt 12 Monate auf das Ausgangsniveau zurück. Da die Patienten größtenteils kein deutlich erhöhtes Atheroskleroserisiko tragen, oder zumindestens keine Ballung mehrerer Risiken, gelten für sie Cholesterinwerte von unter 250 mg/dl, beziehungsweise bei gering erhöhtem Risiko von unter 200 mg/dl als Referenzwerte. Die Patienten liegen zu allen drei Zeitpunkten im Rahmen dieser Werte. Triglyceride liegen allesamt unterhalb des empfohlenen Wertes von 200 mg/dl, wobei ausgehend von 185,40 mg/dl zu Beginn nach 12 Monaten eine nicht sig-

nifikante Senkung des Triglyceridgehaltes erreicht wird. Der gesunkene Wert wird schon nach einem Monat erreicht und dann lediglich gehalten.

Der durchschnittliche LDL-Wert (low-density-lipoprotein) ahmt die Veränderung der Cholesterinwerte nach, jedoch für die Steigerung im ersten Monat signifikant, den Abfall in den darauffolgenden 11 Monaten annähernd signifikant.

Der durchschnittliche VLDL-Wert (very-low-density-lipoprotein) fällt wie die Triglyceride im Verlaufes des beobachteten Jahres nicht signifikant ab.

HDL (high-density-lipoprotein) erfährt einen leichten Anstieg, und liegt mit Werten über 40 mg/dl innerhalb des empfohlenen Rahmens.

Alle Zeitpunkte betrachtet liegt das Verhältnis von LDL zu HDL unter beziehungsweise bei 3.

Im Fettsäuremuster im Plasma sind in keiner der verschiedenen Fettsäuregruppen Unterschiede gefunden worden. Weder die Gesamtfettsäuren noch die einzelnen Bestandteile gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren zeigten über 12 Monate nennenswerte Veränderungen.

Plasma	Vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Gesamtfettsäuren (mg/dl)	448,27± 167,82	463,36± 159,24	444,00± 131,34	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Gesättigte Fettsäuren (mg/dl)	141,80± 69,61	141,76± 61,35	138,51± 46,12	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Einfach ungesättigte Fettsäuren (mg/dl)	128,48± 61,40	127,01± 59,28	112,98± 55,75	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (mg/dl)	177,99± 42,79	194,59± 70,57	182,51± 50,30	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.

Gesättigte FS % (*)	30,78± 3,06	30,28± 4,51	30,94± 2,40	0 vs.1 M. n.S. 0 vs.12 M. n.S. 1 vs.12 M. n.S.
Einfach ungesättigte FS % (*)	28,45± 3,21	26,95± 5,50	27,47± 3,49	0 vs.1 M. n.S. 0 vs.12 M. n.S. 1 vs.12 M. n.S.
Mehrfach ungesättigte FS % (*)	41,17± 5,74	42,81± 9,23	41,59± 4,76	0 vs.1 M. n.S. 0 vs.12 M. n.S. 1 vs.12 M. n.S.

(*) bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin im Plasma

Neben den absoluten Werten gilt die gleiche Beobachtung auch für die prozentualen Werte bezogen auf die Gesamtfettsäuren. Diese Beobachtung ist von anderen Gruppen ebenfalls gemacht worden [Schippling 2000].

4.3 Messung der Lipide im Liquor

Der Cholesteringehalt im Liquor steigt signifikant an im Verlaufe eines Jahres ($p = 0,007$). Diese Entwicklung ist schon nach einem Monat signifikant ($p = 0,02$). Die Beobachtung wurde nach Vitamin E und C-Supplementierung schon vorher gesehen [Kontush et al. 2001].

Die durchschnittlichen Gesamtfettsäuren steigen ebenfalls an, und erreichen Signifikanz. Zunächst zeigen sie abfallende Tendenz im Laufe des ersten Monats. Aufgegliedert in die verschiedenen gesättigten Fettsäuren ist diese Beobachtung deutlich im durchschnittlichen Gehalt einfach ungesättigter Fettsäuren zu sehen, hier mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Auch die mehrfach ungesättigten Fettsäuren steigen nach einem Monat zunächst nicht signifikant, nach weiteren 11 Monaten erreicht auch dieser Anstieg Signifikanz ($p = 0,02$). Gesättigte Fettsäuren steigen ebenfalls an, erreichen jedoch keine Signifikanz.

Wichtig ist hier die Betrachtung der prozentualen Werte. Bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin im Liquor kann keine signifikante Veränderung beobachtet werden, allein die einfach ungesättigten Fettsäuren ahmen nach wie vor die Tendenz zu den ansteigenden absoluten Werten nach.

Liquor	Vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Gesamtfettsäuren (mg/l)	12,34± 2,75	11,77± 2,36	14,78± 3,70	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. p= 0,04 1 vs.12 M. p= 0,09
Gesättigte Fettsäuren (mg/l)	5,90± 1,75	5,12± 0,69	6,65± 2,62	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Einfach ungesättigte Fettsäuren (mg/l)	4,09± 1,31	4,17± 1,36	5,30± 0,86	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. p= 0,009 1 vs.12 M. p= 0,009
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (mg/l)	2,35± 0,69	2,49± 0,89	2,83± 0,76	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. p= 0,02 1 vs.12 M. n.s.
Cholesterin (mg/l)	4,43± 1,91	5,09± 1,70	7,69± 3,61	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. p= 0,007 1 vs.12 M. p= 0,02
Gesättigte FS % (*)	47,90± 8,88	44,79± 9,77	43,91± 7,35	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Einfach ungesättigte FS % (*)	33,06± 6,41	34,64± 6,40	36,74± 5,07	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Mehrfach ungesättigte FS % (*)	19,04± 4,49	20,56± 5,74	19,35± 3,32	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.

(*) bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin im Liquor

Die einzelnen Fettsäuren aufgeschlüsselt, werden teilweise Signifikanzen erreicht. Die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (16:0) und Stearinsäure (18:0) entwickeln sich gegenläufig, während erstere im Laufe eines Jahres nicht signifikant abfällt, steigt letztere schon nach einem Monat signifikant an und behält diese Bewegung bis zum Ende der 12 Monate bei ($p < 0,03$). Die einfach unge-

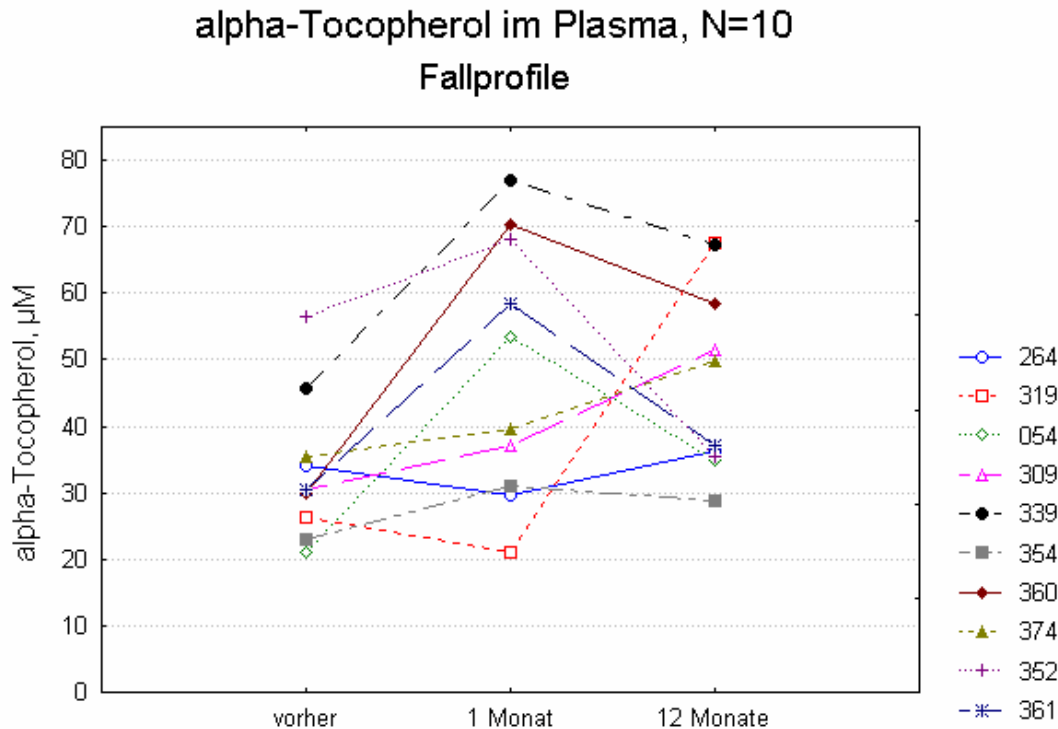
sättigten Fettsäuren Oleinsäure (18:1 n-9) und Vacceninsäure (18:1 n-7) steigen beide an, wobei nur erstere Signifikanz erreicht ($p < 0,02$). Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linoleinsäure (18:2 n-6) und Arachidonsäure (20:4 n-6) steigen beide an, nur letztere erreicht Signifikanz ($p < 0,03$).

4.4 Konzentration von Vitamin E im Plasma

Die α -Tocopherol-Werte wurden zu den Zeitpunkten 0, 1 und 12 Monate mithilfe der HPLC bestimmt.

Plasma	Vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Vitamin E ($\mu\text{mol/l}$)	33,26 $\pm$ 10,66	48,59 $\pm$ 19,47	46,75 $\pm$ 14,24	0 vs. 1 M $p = 0,02$ 0 vs. 12 M $p = 0,03$ 1 vs. 12 M n.s.
Vitamin E, bezogen auf Cholesterin ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	2,90 $\pm$ 0,64	4,12 $\pm$ 1,54	3,99 $\pm$ 0,79	0 vs. 1 M $p < 0,03$ 0 vs. 12 M $p < 0,04$ 1 vs. 12 M n.s.
Vitamin E, bezogen auf Cholesterin und Fettsäuren ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$)	0,99 $\pm$ 0,35	1,41 $\pm$ 0,62	1,32 $\pm$ 0,32	0 vs. 1 M $p < 0,02$ 0 vs. 12 M $p < 0,06$ 1 vs. 12 M n.s.

Vor Beginn der Studie wiesen die Patienten einen durchschnittlichen α -Tocopherol-Plasma-Wert von 33,26 $\mu\text{mol/l} \pm 10,66$ auf. In Ermangelung einer Kontrollgruppe nicht-dementer Personen kann man diesen Wert nicht ins Verhältnis setzen. In der Literatur werden für AD-Patienten in der Regel niedrigere Werte gefunden [Foy et al. 1999 : 23,5 $\mu\text{mol/l}$; Jiménez-Jiménez et al. 1997 : AD-Patienten 24,3 $\mu\text{mol/l}$ und Kontrollgruppe 31,3 $\mu\text{mol/l}$; Schippling et al. 2000 : AD-Patienten 22,3 $\mu\text{mol/l}$ und Kontrollgruppe 24,6 $\mu\text{mol/l}$]. Nach einem Monat Vitamingabe erhöht sich der α -Tocopherol-Plasmaspiegel signifikant auf 48,59 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,02$) und behält dieses Niveau über die verbleibenden 11 Monate der Vitamingabe mit einem geringen Abfall bei. Trotz weiterer Vitaminzufuhr wird der Spiegel im Plasma nicht weiter gesteigert. Bei genauerer Betrachtung (siehe Abbildung) überwiegt die Anzahl der Patienten, deren Vitamin E-Gehalt im Plasma nach dem initialen Anstieg abfällt denen, deren Vitamin E-Gehalt noch weiter ansteigt.



Hier soll auf ein einführend genanntes Problem hingewiesen werden: zwei Patienten (264 und 319) wurden bei Beginn und nach einem Monat von anderen Personen gemessen. Wie aus Grafik 1 ersichtlich, ist deren Vitamin E-Entwicklung auffallend der später gemessenen verschieden. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen methodischen Fehler, der hier leider in dieser Weise akzeptiert werden muss.

Da Vitamin E mit der Konzentration der Gesamtlipide korreliert, ist es ratsam, lipidstandardisierte Vitamin E-Werte zu berechnen. Vor Beginn der Studie liegt Vitamin E im Plasma in einem Verhältnis von 0,99 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ zur Konzentration der Gesamtlipide (Cholesterin und Gesamtfettsäuren) vor. Dieses Verhältnis erhöht sich signifikant zugunsten des Vitamin E ($p < 0,02$).

Viele Gruppen beziehen Vitamin E jedoch nur auf das Gesamtcholesterin. Vollziehe ich das nach, beobachte ich ähnliche Ergebnisse. Das Verhältnis Vitamin E zu Cholesterin beträgt durchschnittlich vor Studienbeginn 2,90 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, steigert sich nach einem Monat signifikant auf 4,12 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ($p < 0,03$) und fällt nur leicht im weiteren Verlauf des Jahres auf 3,99 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$. In der Literatur findet man Vergleichswerte [unter anderem Foy et al. 1999: AD-Patienten 4,3 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ und Kontrolle 4,7 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; Jiménez-Jiménez et al. 1997: AD-Patienten 4,54 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ und Kontrolle 5,61 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$].

Die Steigerung der Vitamin E-Konzentration lässt sich prozentual zum Ausgangswert darstellen. Zwischen Anfangswert und Wert nach einmonatiger Vitamingabe liegt eine Steigerung um durchschnittlich 50,6 % vor, zwischen Anfangswert und Endwert nach 12 Monaten liegt eine Steigerung von 49,3 % vor. Eine andere Gruppe [Kontush et al. 2001] stellte ähnliche Berechnungen und fand eine Steigerung von 35 % für Vitamin E im Plasma nach ebenfalls einmonatiger Vitamingabe.

4.5 Konzentration von Vitamin E im Liquor

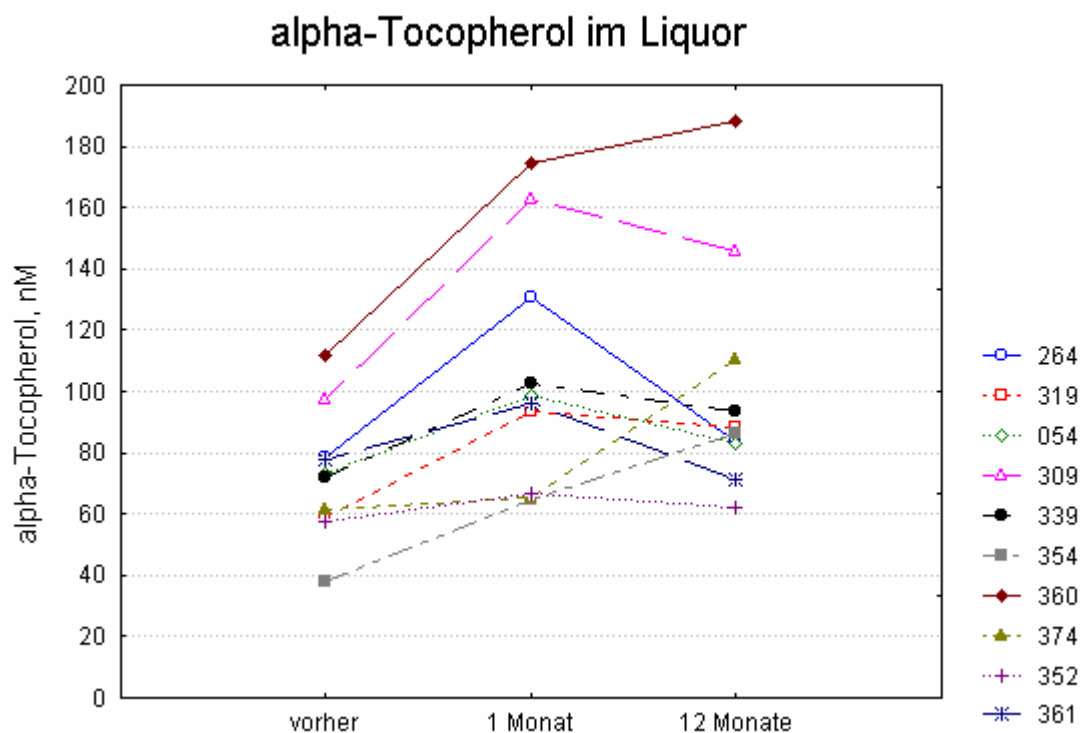
Zum Zeitpunkt vor Einnahme der Vitamine liegen die durchschnittlichen α -Tocopherol-Konzentrationen bei 72,06 nmol/l. Erstaunlicherweise liegen diese Werte deutlich höher als von anderen Gruppen gemessene Konzentrationen [Schippling et al. 2000: AD-Patienten 45,5 nmol/l und Kontrolle 56,7 nmol/l].

Liquor	vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Vitamin E (nmol/l)	72,057 $\pm$ 21,00	105,61 $\pm$ 39,00	101,26 $\pm$ 38,21	0 vs. 1 M p= 0,0051 0 vs. 12 M p< 0,01 1 vs. 12 M n.s.
Vitamin E, bezogen auf Cholesterin und Fettsäuren (nmol/mg)	4,44 $\pm$ 1,41	6,36 $\pm$ 2,19	4,56 $\pm$ 1,04	0 vs. 1 M p< 0,007 0 vs. 12 M n.s. 1 vs. 12 M p< 0,03

Im Verlauf des ersten Monats steigen die Konzentrationen hochsignifikant an auf Werte von 105,61 nmol/l ($p < 0,001$), fallen dann nur leicht wieder ab auf Werte von 101,26 nmol/l. Die α -Tocopherol-Konzentrationen sind so niedrig, dass sie nicht zwischen verschiedenen Laboren verglichen werden können. Möglicherweise sind die Analysesysteme und die Probenaufbereitung verschieden. Möglicherweise gelingt es durch die hier angewendete Probenaufbereitung mit Hexan eine vergleichsweise höhere Menge des tatsächlich vorhandenen α -Tocopherols zu bestimmen. Alle hier aufgeführten Ergebnisse wurden mit gleicher Methodik, gleichen Mengen, gleichen Geräten aufbereitet und sind somit untereinander vergleichbar.

Hier erscheint die Standardisierung auf Cholesterin und Gesamtfettsäuren im Liquor sehr aufschlussreich. Der initiale Anstieg nach einem Monat ist vergleichbar, von einem Verhältnis von 4,44 nmol/mg auf 6,36 nmol/mg zugunsten des Vitamin E ($p < 0,007$). Im Verlauf der restlichen 11 Monate jedoch fällt das Verhältnis ab auf 4,56 nmol/mg ($p < 0,03$), dies entspricht in etwa den Werten des Anfangsniveaus.

Die Abbildung verdeutlicht die Zahlenwerte anhand von Fallprofilen. Nur zwei Patienten spiegeln nicht die obengenannte Beobachtung wider, sie steigern ihre Vitamin E-Konzentration im Liquor auch noch nach einem Monat.



Die Konzentration des Vitamin E im Liquor ist vom Studienbeginn bis zum Zeitpunkt 1 (ein Monat) um durchschnittlich 40,3 % gesteigert. Von Studienbeginn bis Studienende liegt die Steigerung bei durchschnittlich 43,0 %.

Eine andere Studie in unserem Labor fand bei gleichem Vorgehen im Liquor eine Steigerung der Vitamin E-Konzentration von 56 %. Entgegen ihrer Beobachtungen steigert Vitamin E im Plasma relativ stärker seine Konzentration als Vitamin E im Liquor [Kontush et al. 2001].

4.6 Gegenüberstellung der Vitamin E – Konzentrationen im Plasma und im Liquor

Diese Überlegung ist angefügt, um eventuelle tendenzielle Konzentrationsänderungen zu erkennen. Dargestellt sind die Vitamin E-Konzentrationen für jeden einzelnen Patienten jeweils im Plasma und im Liquor in Abbildung 1 (Anhang). Man darf nicht dem Fehler unterliegen, die beiden Konzentrationen (Plasma-Skala rechts, Liquor-Skala links) direkt zu vergleichen. Vitamin E liegt im Liquor um den Faktor 1000 geringer vor (nmol/l zu $\mu\text{mol/l}$). Möglicherweise lässt sich anhand dieser Darstellung erkennen, ob in beiden Kompartimenten kongruente Bewegungen, ob zunehmender oder abnehmender Natur, ablaufen.

Aus den gezeigten grafischen Abbildungen kann man keine einheitlichen Schlüsse ziehen. Die Konzentrationsveränderungen scheinen in keinem direkten Zusammenhang zu stehen. Es werden Verläufe beobachtet, in denen nach offensichtlich maximaler Plasmakonzentration ein Abfall erfolgt, beziehungsweise keine weitere Zunahme, während die Vitamin E-Konzentration im Liquor weiterhin ansteigt. Umgekehrt werden auch Verläufe beobachtet, in denen die Plasmakonzentration ansteigt, während die Liquorkonzentration stagniert beziehungsweise leicht verringert wird. Als letztes werden auch Verläufe beobachtet, in denen Plasma- und Liquorkonzentration vergleichbare Bewegungen zeigen, das heißt, zunächst ansteigt bis zum Zeitpunkt 1 Monat, anschließend abfällt bis zum Zeitpunkt 12 Monate.

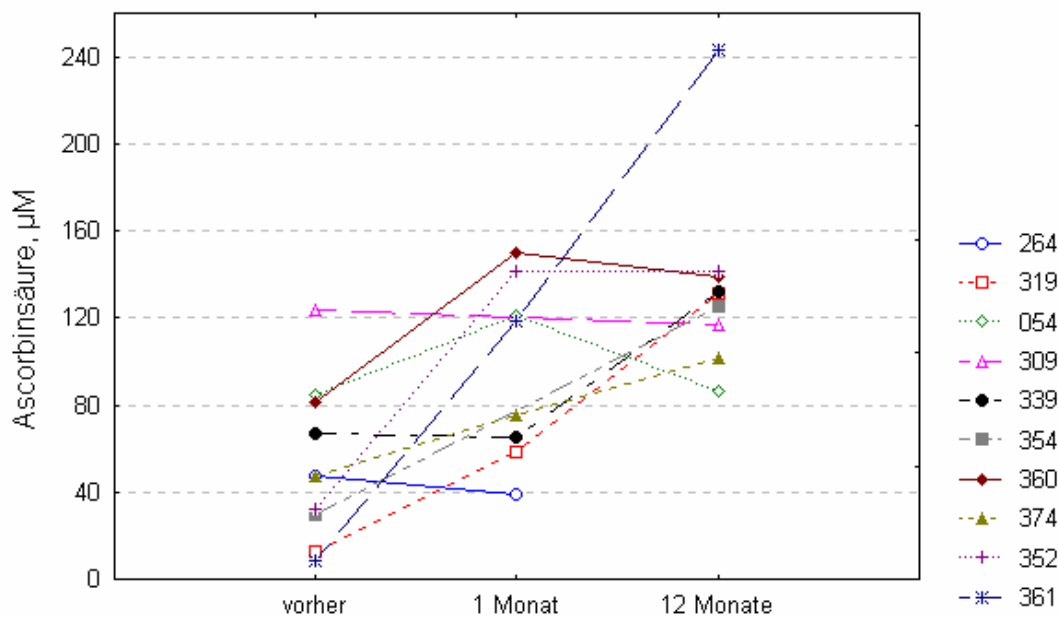
4.7 Konzentration von Vitamin C im Plasma

Vitamin C wurde an drei Zeitpunkten photometrisch bestimmt. Zum geringstmöglichen Verlust durch oxidative Prozesse wird das Plasma kurz nach der Blutentnahme und Zentrifugation mit Phosphorsäure versetzt, wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben. Im Folgenden sind verschiedene Messungen der Vitamin C-Konzentrationen betrachtet, da nicht alle Proben derart aufbereitet zur Verfügung standen.

Plasma	Vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Vitamin C, Plasma (μM) vorbereitet nach Blutentnahme	47,74 $\pm$ 31,28	104,24 $\pm$ 37,45	139,22 $\pm$ 50,05	0 vs.1 M $p < 0,03$ 0 vs.12 M $p < 0,02$ 1 vs.12 M n.S.
Vitamin C; Plasma (μM) vorbereitet nach Auftauen	25,99 $\pm$ 17,02	61,38 $\pm$ 24,49	118,37 $\pm$ 34,17	0 vs.1 M $p < 0,02$ 0 vs.12 M $p < 0,02$ 1 vs.12 M $p < 0,02$.

Zunächst lege artis aufbereitetes Plasma, die Konzentration liegt vor Studienbeginn bei durchschnittlich 47,74 $\mu\text{mol/l}$. Die Vitaminsupplementierung steigert die Konzentration signifikant auf durchschnittlich 104,24 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,03$), nach weiteren 11 Monaten findet man noch eine weitere Steigerung auf durchschnittlich 139,22 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,02$).

Vitamin C im Plasma, N=10
(vorbereitet nach Blutentnahme)

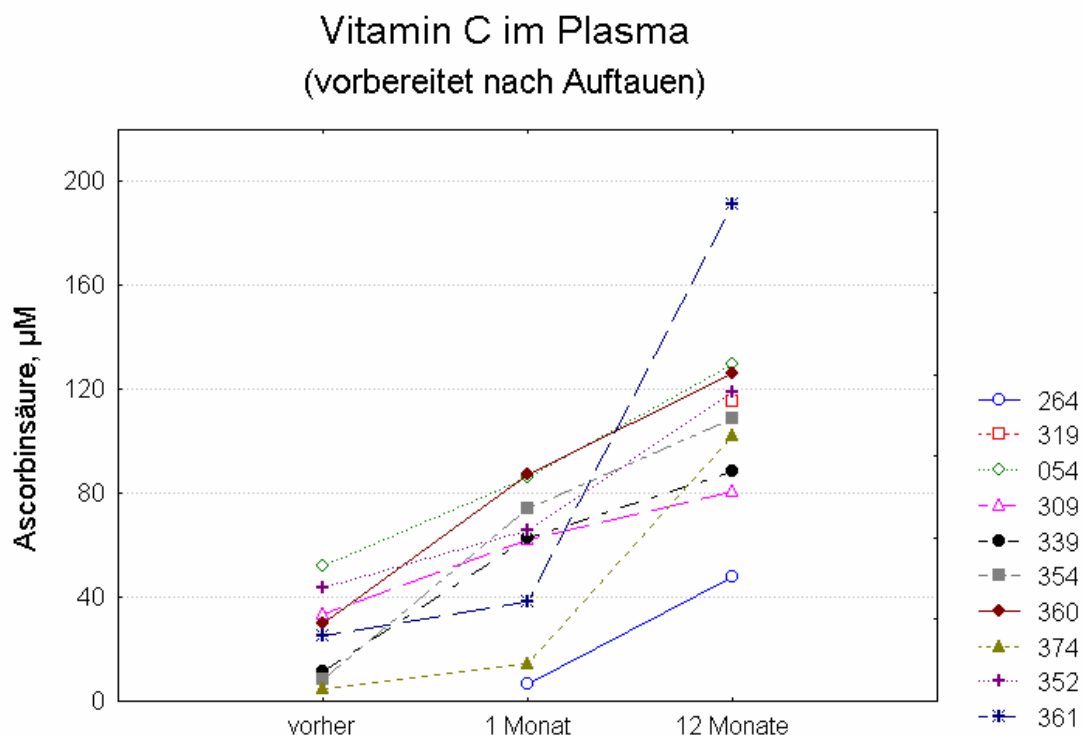


Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderung der einzelnen Patienten

Es ist deutlich erkennbar, dass die hauptsächliche Konzentrationssteigerung während der ersten Zeit der erhöhten Vitaminzufuhr stattfindet, die relative Steigerung pro weiterem Monat ist quantitativ nicht mit dem ersten vergleich-

bar. Die prozentuale Konzentrationssteigerung ist enorm, im ersten Monat im Schnitt um 129 %, ein Patient sogar mehr als zehnfach gesteigert (in mittlerer Steigerung nicht eingeschlossen), im gesamten betrachteten Zeitraum eine durchschnittliche Steigerung von 237 % (auch hier eine außergewöhnliche Steigerung des besagten Patienten um mehr als das 25-fache).

.Als zweites sind die Vitamin C-Messungen betrachtet, die in Ermangelung der sofort mit Phosphorsäure versetzten erst nach der Lagerung und dem Auftauen mit Phosphorsäure versetzt wurden. Von acht Patienten waren die Proben verfügbar, und bieten für diese acht eine einheitliche Aufbereitung und Messung.



Die Abbildung zeigt die Konzentrationsänderung der einzelnen Patienten.

Die durchschnittliche Konzentration von Vitamin C liegt bei 25,99 µmol/l, steigt sich nach einem Monat signifikant auf 61,38 µmol/l ($p < 0,02$) und erreicht nach einem Jahr 118,37 µmol/l ($p < 0,02$). Die Werte liegen erwartungsgemäß unter den im erstgenannten Verfahren gemessenen. Schließlich nimmt man an, dass durch die verzögerte Aufbereitung oxidative Prozesse die Vitamin C-Konzentration verringern. Die durchschnittliche Steigerung liegt im ersten Mo-

nat bei 164 %, im gesamten Zeitraum bei 508 % im Vergleich zum Ausgangswert. Es sind einzelne außergewöhnlich hohe Steigerungen zu beobachten.

Die logische Frage, inwiefern sich verschieden aufbereitete Plasmaproben zur Vitamin C-Bestimmung vergleichen lassen, ist mit diesen Ergebnissen nicht zu beantworten. Tendenziell sind in beiden Messverfahren ähnliche Konzentrationssan- und -abstiege für den einzelnen Patienten zu erkennen. Ein Faktor, der den Verlust durch die Lagerung und verzögerte Aufbereitung beschreibt, ist nicht übereinstimmend zu erkennen. Aus der Literatur ist bekannt, dass frisch aufbereitetes Plasma (und Liquor) innerhalb der ersten zwei Stunden bei Raumtemperatur 3,5% des Vitamin C-Gehaltes verliert. Bei -60°C verlieren die Proben bei Lagerung von mehr als drei Monaten 6% [Reiber et al. 1993].

Bislang ist wahrscheinlich weder etwas bekannt über den Verlust von Vitamin C bei Proben, die maximal 18 Monate gelagert sind (siehe 3.1.2.) noch über den Verlust pro Probe bei nicht-korrekt verzögerter Aufbereitung.

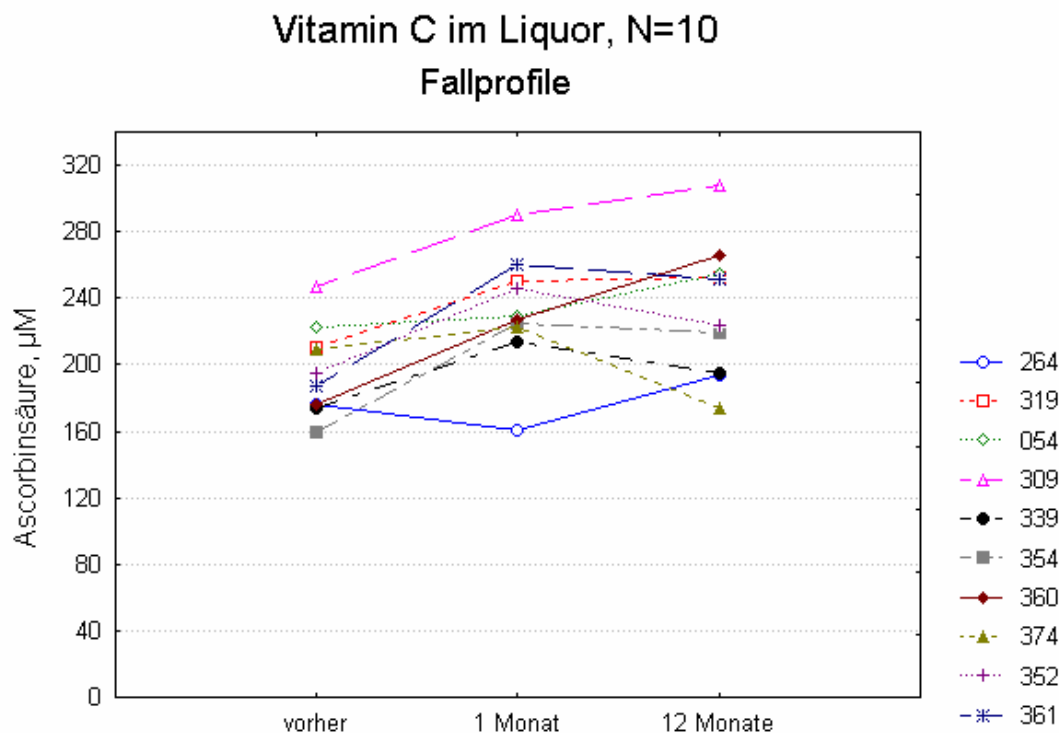
4.8 Konzentration von Vitamin C im Liquor

Der Vitamin C-Gehalt des Liquors vor Studienbeginn lag bei durchschnittlich $195,80 \mu\text{mol/l}$, damit liegt er erstaunlicherweise weniger vermindert vor, als man bei AD-Patienten erwarten würde. Andere Studien geben eine mit $166,7 \mu\text{mol/l}$ bei AD-Patienten im Vergleich zu $193,4 \mu\text{mol/l}$ bei Kontrollgruppen erniedrigte Konzentration an [Schippling et al. 2000; ebenso Paraskevas et al. 1997 mit $156,65 \mu\text{mol/l}$ bei AD-Patienten und $166,0 \mu\text{mol/l}$ bei Kontrollen; Lönnrot et al. 1996 mit $197,0 \mu\text{mol/l}$ bei gesunden Probanden; Reiber et al. 1993 mit $157,5 \mu\text{mol/l}$ bei Kontrollgruppen].

Liquor	vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Vitamin C, Liquor (μM)	$195,80 \pm 26,64$	$232,50 \pm 33,85$	$233,89 \pm 40,27$	0 vs.1 M $p < 0,02$ 0 vs.12 M $p < 0,03$ 1 vs.12 M n.s.

Nach einem Monat Vitamingabe steigert sich die Konzentration um durchschnittlich 19,5 % auf 232,50 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,02$). Der Wert wird im Verlauf des Jahres gehalten und liegt am Studienende bei 233,89 $\mu\text{mol/l}$. In einer anderen Studie wurde eine Steigerung von 17 % für Vitamin C im Liquor nach einmonatiger Vitamingabe bei AD-Patienten gefunden [Kontush et al. 2001].

Die Abbildung veranschaulicht die Konzentrationsänderung für die einzelnen Patienten.



4.9 Gegenüberstellung der Konzentration von Vitamin C im Plasma und im Liquor

Die Darstellung der Konzentrationen von Vitamin C im Liquor und im Plasma jeweils für jeden Patienten soll der besseren Veranschaulichung der An- und Abstiege dienen (Abbildung 2, Anhang). In beiden Kompartimenten liegen die Konzentrationen in etwa im gleichen Größenbereich, das heißt in der gleichen Einheit, vor. Auf den ersten Blick wird deutlich, dass Vitamin C im Liquor grundsätzlich höher konzentriert ist als im Plasma, es liegt eine drei bis sechsfach höhere Konzentration vor. Solche Beobachtungen wurden auch von anderen Gruppen gemacht [Schippling et al. 2000: Ascorbinsäure im Liquor drei- bis fünffach erhöht].

Es wird postuliert, dass das Verhältnis zwischen Liquor zu Plasma die Aktivität des Ascorbinsäure-Transporters im Plexus choroideus widerspiegelt [Paraskevas et al. 1997].

Korrelationen zwischen Plasma- und Liquorkonzentration von Vitamin C sind $r=0,39$ ($p<0,03$). Lönnrot et al. (1996) fand eine Korrelation von $r=0,46$, $p<0,08$.

Aufgrund der Beobachtung, dass das Liquor/Serum –Verhältnis bei steigender Serumkonzentration abfällt, wurde vermutet, dass Ascorbinsäure im Liquor sättigbar ist [Reiber et al. 1993]. In den vorliegenden Daten wird die gleiche Beobachtung gemacht. Während bei Studienbeginn ein durchschnittliches Verhältnis von Liquor- zu Plasmakonzentration von 11,8 vorliegt, verringert sich das nach einmonatiger Gabe auf 5,4 und fällt bis zum Studienende auf durchschnittlich 2,2.

4.10 Gehalt von Vitamin E und Vitamin C im Plasma

Vitamin C wird vom Körper über einen anderen Mechanismus aufgenommen und unterliegt auch aufgrund seiner Hydrophilie anderen Transportmechanismen als Vitamin E. Die Aufnahme erfolgt über aktiven, bei sehr hohen Konzentrationen auch über passiven Transport.

Vitamin E hingegen als lipophiles Vitamin steht in engem Zusammenhang zum Fettstoffwechsel, wird mit den Fetten gebunden und transportiert.

Ein Zusammenhang zwischen Konzentrationen beider Vitamine ist im Plasma sehr unwahrscheinlich. Es wurden keine Korrelationen gefunden. Abbildung 3 (Anhang) stellt beide Vitamine für jeden Patienten im Plasma dar. Die gelegentlich erkennbaren Ähnlichkeiten im Anstieg der Konzentrationen stehen wahrscheinlich in keinem kausalen Zusammenhang.

4.11 Gehalt von Vitamin E und Vitamin C im Liquor

Interessanter hingegen ist die Fragestellung, ob die Gegenüberstellung der Konzentrationen des wasserlöslichen Vitamins C und des fettlöslichen Vitamin E im

Liquor Vermutungen über ihre Transportmechanismen ins Zentrale Nervensystem gestatten.

Ascorbinsäure tritt hauptsächlich durch aktiven, Natrium-abhängigen, stereospezifischen Transport im Plexus choroideus in den Liquor über, Nebenwege bieten ein Carrier-vermittelter Transport und Diffusion über Hirnkapillaren an der Blut-Hirn-Schranke [Rice 2000].

Es wurde ein spezifisches Transportprotein für Ascorbinsäure in den Plexus choroideus beschrieben, welches konstant hohe Konzentrationen im Liquor gewährleistet [Lönnrot et al. 1996].

Auch für Vitamin E werden Transportproteine angenommen. Es wurden sogenannte α -Tocopherol-Transport-Proteine erwähnt, wie sie in der Leber bekannt sind, auch (anhand histochemischer Studien) in der Purkinje-Zellschicht des Cortex gefunden. Dies würde für eine Beteiligung am Transport in den Liquor sprechen wurden [Traber et Arai 1999].

Abbildung 4 (Anhang) stellt beide Vitamine in ihren Konzentrationen im Liquor für jeden einzelnen Patienten dar. Zu beachten ist bei dieser Gegenüberstellung, dass Vitamin E in tausendfach niedrigerer Konzentration vorliegt (nmol/l, linke Skala) als Vitamin C (mmol/l, rechte Skala).

Aus den Darstellungen sind keine einheitlichen Schlüsse zu ziehen. Bei fünf Patientenprofilen findet man eine gleichsinnige Bewegung beider Vitamine, das heißt, ein Anstieg eines der Vitamine wird von einem Anstieg des anderen Vitamins begleitet. Drei der Patientenprofile zeigen einen Abfall der Vitamin E-Konzentration während die Vitamin C-Konzentration noch ansteigt. Es besteht anhand dieser Beobachtungen kein zwingender Anlass zu der Vermutung, Vitamin C und Vitamin E-Konzentrationen im Liquor ständen in kausalem Zusammenhang, so etwa über ihre Transportmechanismen.

4.12 Andere Antioxidantien im Plasma

Neben dem hydrophilen Antioxidanz Ascorbinsäure (Vitamin C) und dem lipophilen Antioxidanz α -Tocopherol (Vitamin E) wurden weitere lipophile Antioxidantien bestimmt.

Plasma	vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Ubichinon 10 (µmol/l)	0,170± 0,146	0,211± 0,160	0,124± 0,115	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Ubichinon 10, bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin (nmol/mmol)	6,54± 4,68	7,05± 4,50	2,88± 3,61	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. p<0,05
Ubichinol 10 (µmol/l)	0,380± 0,176	0,369± 0,183	0,364± 0,237	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Ubichinol 10, bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin (nmol/mmol)	11,91± 5,90	9,42± 4,93	10,42± 6,17	0 vs.1 M. p<0,05 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
Verhältnis Ubichinon 10 zu Ubichinol 10	0,447	0,572	0,341	
alpha-Carotin (µmol/l)	0,128± 0,084	0,124± 0,086	0,130± 0,059	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
alpha-Carotin, bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin (nmol/mmol)	3,42± 2,60	3,13± 1,96	3,55± 1,43	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
beta-Carotin (µmol/l)	0,35± 0,30	0,35± 0,33	0,27± 0,27	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
beta-Carotin, bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin (nmol/mmol)	10,78± 9,78	7,96± 6,35	7,42± 6,97	0 vs.1 M. n.s. 0 vs.12 M. n.s. 1 vs.12 M. n.s.
γ-Tocopherol (µmol/l)	4,14± 1,84	2,94± 1,51	2,32± 0,43	0 vs.1 M. p<0,05 0 vs.12 M. p<0,02 1 vs.12 M. n.s.
γ-Tocopherol, bezogen auf Gesamtfettsäuren und Cholesterin (nmol/mmol)	119,87± 65,98	78,41± 39,05	66,65± 17,19	0 vs.1 M. p<0,03 0 vs.12 M. p<0,02 1 vs.12 M. n.s.

Ubichinol hat neben seiner Bedeutung im mitochondrialen Elektronentransport auch zunehmend Bedeutung als Antioxidanz. Sowohl in der oxidierten Form Ubichinon als auch in der reduzierten Form Ubichinol greift es in die oxidativen

Prozesse ein. Ubichinon-10 liegt im Plasma vor Studienbeginn mit durchschnittlich $0,17 \mu\text{mol/l}$ vor, erhöht seine Konzentration leicht auf $0,211 \text{ mmol/l}$, und fällt bis zum Studienende unter Anfangsniveau zurück auf $0,124 \mu\text{mol/l}$. Ubichinol-10 liegt höher konzentriert im Plasma vor, von $0,380 \mu\text{mol/l}$ fällt die Konzentration unbedeutend auf $0,364 \mu\text{mol/l}$. Das Verhältnis zwischen oxidiert und reduzierter Form liegt bei etwa 0,5 und fällt im Laufe eines Jahres von 0,447 auf 0,341 zugunsten der reduzierten Form Ubichinol-10.

Da es sich um lipophile Antioxidantien handelt, ist die Konzentration nach Standardisierung auf Cholesterin und Gesamtfettsäuren aussagekräftiger. Ubichinon erhöht zunächst nach einem Monat gering seine Konzentration, fällt anschließend signifikant ab ($p < 0,05$). Die Ubichinol-Konzentration fällt zunächst ab ($p < 0,05$), um anschließend wieder anzusteigen, jedoch nicht auf Ausgangsniveau.

Als lipophile Antioxidantien wurden weiterhin α - und β -Carotin gemessen. In Pflanzen sind Carotine wichtige Antioxidantien, für den menschlichen Organismus ist ein solcher Zusammenhang fraglich. α -Carotin im Plasma liegt etwa in der gleichen Konzentration wie Ubichinon-10 vor, Werte um $0,128 \mu\text{mol/l}$, es wurden keine Konzentrationsänderungen beobachtet.

β -Carotin ist im menschlichen Körper das sogenannte Provitamin A. Die Absolutwerte der Konzentration liegen bei durchschnittlich $0,35 \mu\text{mol/l}$ und zeigen keine nennenswerten Schwankungen im Laufe des beobachteten Zeitraums. Standardisiert man β -Carotin auf Cholesterin und Gesamtfettsäuren, ist nach einem Monat ein deutlicher Abfall zu verzeichnen, der sich anschließend noch verstärkt, aber keine Signifikanz erreicht.

Die Konzentration von γ -Tocopherol nimmt schon nach einem Monat signifikant ab, und führt diese Bewegung weiter fort. Auch die Standardisierung auf Cholesterin und Gesamtfettsäuren zeigt gleiches, erreicht sogar noch deutlichere Signifikanzen.

Im Gegensatz zum Plasma enthält Liquor nur sehr geringe Mengen lipophiler Antioxidantien. In dieser Studie wurden davon nur Vitamin E-Konzentrationen im Liquor bestimmt.

4.13 Oxidationskinetik im Plasma

Ziel dieser Arbeit ist es unter anderem, einen möglicherweise positiven Effekt von zugeführten Antioxidantien auf oxidative Prozesse, die in der Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung angenommen werden, zu erkennen und zu quantifizieren. Da oxidativer Stress nicht direkt messbar ist, muss man Verfahren anwenden, die indirekt Auskunft über solche Prozesse geben.

Lipoproteine sind ein Angriffsort der Oxidation. Die Lipidperoxidation bietet ein anschauliches Modell. Es sind in der Arbeitsgruppe Beisiegel Methoden entwickelt worden, die eine indirekte Messung der oxidativen Einflüsse auf Lipoproteine erlauben [Kontush et Beisiegel 1999]. Bei der Oxidation von Lipoproteinen fallen intermediäre Oxidationsprodukte an, sogenannte Lipid-Hydroperoxide mit einer konjugierten Dienstruktur, die bei einer Wellenlänge von 234 nm einen Absorptionsanstieg zeigen.

Parallel zur Autooxidation der Plasmaprobe wird AAPH in Konzentration von 33 mM als exogenes Oxidanz eingesetzt. AAPH wirkt als exogener Initiator der Oxidation, sein Wirkungsmaximum liegt bei 37°C.

Wird die Plasmaoxidation mit AAPH initiiert, findet man in der Regel keine verzögerte Akkumulierung von Oxidationsprodukten (sogenannte Lag-Phase), sondern einen konstanten monotonen Absorptionsanstieg. Solche Kurven werden durch einen einzigen Parameter charakterisiert, durch die mittlere Oxidationsrate. Die Messung erfolgt in den ersten sechs Stunden, man spricht von der initialen Oxidationsrate, da sie sofort nach Zugabe des exogenen Oxidanz AAPH in Gang gesetzt wurde.

Für alle drei Zeitpunkte wurde die Autooxidation und die Oxidation mit AAPH im Plasma bestimmt. Die Oxidationsgeschwindigkeit der Oxidation mit AAPH ist, wie zu erwarten, deutlich höher und liegt vor Beginn der Studie bei durchschnittlich 4,23 nM Diene/min. Im Studienverlauf beschleunigt sich die Oxidationsgeschwindigkeit nicht-signifikant um 34 % auf 5,66 nM Diene/min.

Die Oxidationsgeschwindigkeit der Autooxidation zeigt einen ähnlichen Verlauf. Initial liegt sie bei durchschnittlich 1,14 nM Diene/min und beschleunigt sich kontinuierlich auf 1,39 nM Diene/min. Die Steigerung von 22 % fällt im

Vergleich zur Oxidation mit AAPH geringer aus. Auch hier wird keine Signifikanz erreicht.

Für die Ergebnisse der Oxidationsraten von Plasma wurden Korrelationsanalysen gemacht. Die Autooxidationsrate ist mit verschiedenen lipophilen Antioxidantien negativ korreliert: α -Tocopherol $r = -0,37$ ($p=0,027$), α -Carotin $r = -0,47$ ($p=0,004$) und Ubichinol-10 $r = -0,53$ ($p=0,001$).

Die Oxidationsrate mit AAPH korreliert positiv mit den Gesamtfettsäuren im Plasma ($r = 0,46$, $p=0,005$), den mehrfach ungesättigten Fettsäuren ($r = 0,48$, $p=0,003$) und den gesättigten Fettsäuren ($r = 0,44$, $p=0,007$). Negative Korrelation besteht zum Ubichinol-10-Gehalt des Plasmas ($r = -0,54$, $p=0,001$).

Teilweise wurden diese Ergebnisse auch von anderen Gruppen gefunden: Plasma-Oxidierbarkeit korreliert positiv mit Gehalt an oxidierbaren Fettsäuren; negative Korrelation der maximalen Plasma-Oxidationsrate mit Ascorbinsäure-, α -Tocopherol-, Ubichinol-10-Gehalt; im Gegensatz dazu: positive Korrelation mit Ubichinol-10-Gehalt [Kontush et al. 1999]; eine negative Korrelation der Autooxidationsrate mit α -Tocopherol und α -Carotin (und Ascorbinsäure [Schippling et al. 2000]).

4.14 Oxidationskinetik im Liquor

Die von Kontush et Beisiegel (1999) entwickelte Methode zur quantitativen Bestimmung der Oxidierbarkeit von Plasmalipoproteinen wurde auf die Oxidierbarkeit von Liquorlipoproteinen adaptiert [Arlt et al. 2000].

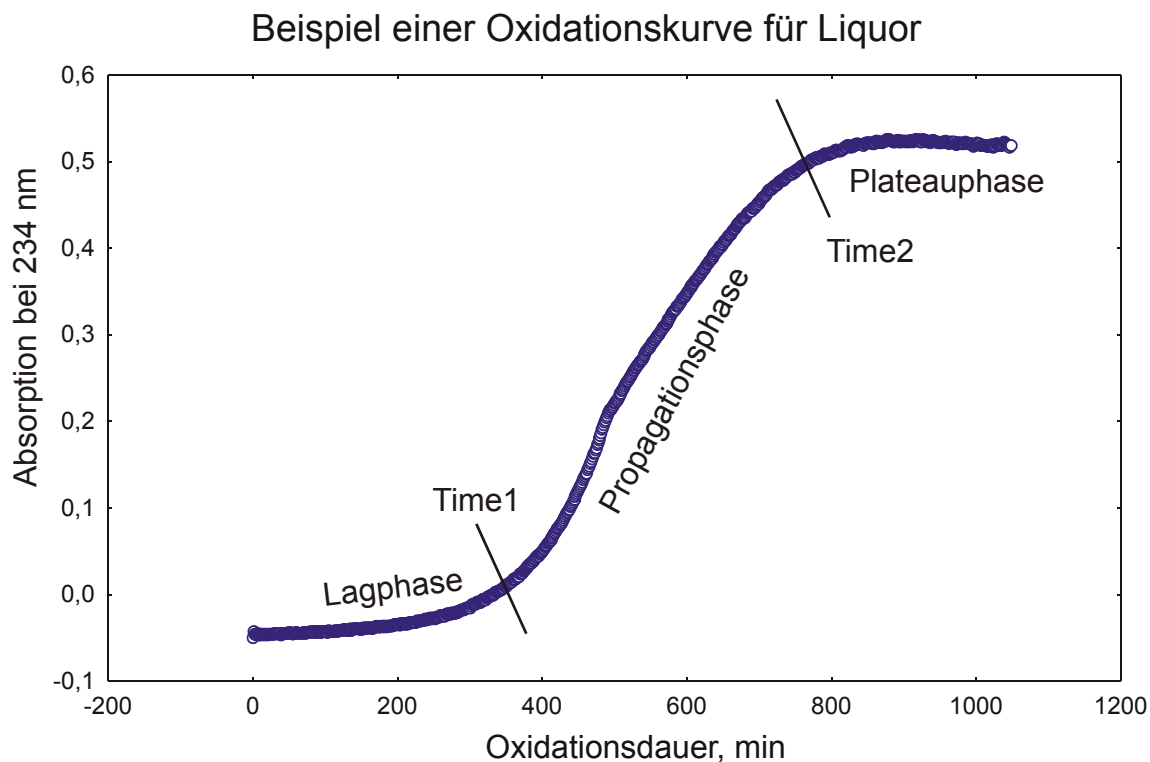
Eine autokatalytisch verlaufende Liquoroxidation zeigt bei der Absorption bei 234 nm einen typischen Verlauf in drei aufeinanderfolgenden Phasen:

die **Lag-Phase**, in der die Oxidationsrate gemessen in nM Diene/min nahe Null ist,

die **Propagationsphase**, in der die Oxidationsrate durch fortlaufende Akkumulation von Oxidationsprodukten maximal ansteigt, und

die **Plateau-Phase**, in der die Oxidationsrate wieder nahe Null ist.

Die Phasen sind in der Abbildung exemplarisch dargestellt.



Von Bedeutung für die Beurteilung der Ergebnisse ist neben der **Rate**, welche der Anstiegsgeschwindigkeit der anfallenden Diene entspricht, die **Time**, welche dem Zeitpunkt des Umschlags entspricht zwischen Lag- und Propagationsphase und zwischen Propagations- und Plateau-Phase. Diese liegen im Schnittpunkt der Anstiegsgeraden der Oxidationsraten.

In der hier vorliegenden Studie wurden zu den drei Zeitpunkten (vor Studienbeginn, nach einem Monat und nach 12 Monaten Vitamin E- und C-Gabe) Liquoroxidationsmessungen in Abwesenheit (Autooxidation) und Anwesenheit exogener Oxidantien (1mM AAPH) gemacht. Die entstehenden Absorptionskurven wurden charakterisiert durch Rate 1 (Anstieg in Lag-Phase), Time 1 (Zeitpunkt des Beginns der Propagationsphase), Rate 2 (Anstieg in Propagationsphase) und Time 2 (Zeitpunkt des Beginns der Plateau-Phase).

	vorher (0 Monate)	1 Monat	12 Monate	p-Wert
Autooxidation				
Rate 1	2,76± 2,52	2,83± 2,58	2,01± 1,73	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
Rate 2	46,29± 13,70	44,11± 14,37	35,47± 9,19	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. p= 0,07 1 vs. 12 M. n.s.
Time 1	226,40± 119,60	287,20± 113,00	196,60± 61,43	0 vs. 1 M. p= 0,07 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. p= 0,03
Time 2	220,20± 56,85	225,20± 72,71	234,80± 54,23	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
Oxidation mit AAPH				
Rate 1	5,04± 4,73	4,07± 3,84	3,97± 1,42	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
Rate 2	41,45± 14,97	34,08± 13,36	39,34± 9,10	0 vs. 1 M. p= 0,05 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
Time 1	254,60± 119,24	315,70± 196,26	284,60± 65,73	0 vs. 1 M. n.s. 0 vs. 12 M. n.s. 1 vs. 12 M. n.s.
Time 2	237,50± 44,03	251,40± 58,24	289,60± 70,76	0 vs. 1 M. p= 0,09 0 vs. 12 M. p= 0,07 1 vs. 12 M. n.s.

Erhöhte Oxidationsrate in der Lag- und Propagationsphase und eine kürzere Dauer der Lag- und Propagationsphase sprechen für eine schnellere Oxidation der Lipoproteine. Anders ausgedrückt werden als Korrelat eines effektiven An-

tioxidationsschutzes eine Verringerung der Oxidationsrate und eine Verlängerung der Phasendauer (Time) erhofft.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss man sich immer vor Augen halten, dass die Menge der anfallenden Oxidationsprodukte von mehr als einer Variablen bestimmt werden. Eine gesteigerte Rate mit einer verkürzten Dauer kann ein gleiches Ergebnis bedeuten wie eine verminderte Rate, die über einen längeren Zeitraum anhält.

Bei der Autooxidation korreliert eine geringe Oxidationsrate in der Lag-Phase positiv mit einer geringen Rate in der Propagationsphase ($r = 0,37$, $p = 0,03$), und eine kurze Dauer der Lag-Phase mit einer kurzen Dauer der Propagationsphase ($r = 0,38$, $p = 0,03$). Bei der Oxidation mit AAPH korrelieren hingegen die Rate und Dauer der Lag- beziehungsweise Propagationsphasen negativ miteinander (Rate 1 zu Time 1 $r = -0,40$, $p = 0,02$; Rate 2 zu Time 2 $r = -0,34$, $p = 0,05$). Eine kurze Lag-Phasendauer korreliert mit einer gesteigerten Oxidationsrate in der nachfolgenden Propagationsphase ($r = 0,35$, $p = 0,04$).

Weiterhin hängt die Oxidationskinetik entscheidend von dem zur Verfügung stehenden Substrat ab.

Bei der Autooxidation korreliert die Dauer der initialen Lag-Phase positiv mit dem prozentualen Gehalt an gesättigten Fettsäuren ($r = 0,34$, $p = 0,046$) und negativ mit dem prozentualen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ($r = -0,39$, $p = 0,022$). Arachidonsäure allein korreliert stärker negativ mit der Dauer der Lag-Phase ($r = -0,48$, $p = 0,004$). Bei der Oxidation mit AAPH bestehen vergleichbare Korrelationen für die Fettsäuren (PUFA% gegen Time 1: $r = -0,42$, $p = 0,013$; SFA% gegen Time 1: $r = 0,35$, $p = 0,041$). Arachidonsäure korreliert hier zusätzlich positiv mit der Oxidationsrate während der Lag-Phase ($r = 0,37$, $p = 0,031$).

Es wurde vorgeschlagen, dass das Verhältnis von PUFA's zu gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren und der Gehalt endogener Peroxide im LDL eine Rolle in der Oxidationskinetik spielen könnte [Esterbauer et al. 1992]. In der hier vorliegenden Studie besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Verhältnis von mehrfach ungesättigten zu einfach ungesättigten Fettsäuren und der Dauer der Propagationsphase ($r = -0,42$, $p = 0,026$).

Als nächstes möchte ich auf die Veränderungen im Studienverlauf eingehen.

	RATE 1	TIME 1	RATE 2	TIME 2
	Lagphase		Propagationsphase	
AUTO				
1 Monat	↔	↑ (p<0,07)	↓	(↑)
12 Monate	↓	↓ (p<0,05)	↓	↑
AAPH				
1 Monat	↓	↑	↓ (p<0,05)	↑
12 Monate	↔	↓	↑	↑

RATE n - Oxidationsgeschwindigkeit bis zum Zeitpunkt TIME n (n=1,2)

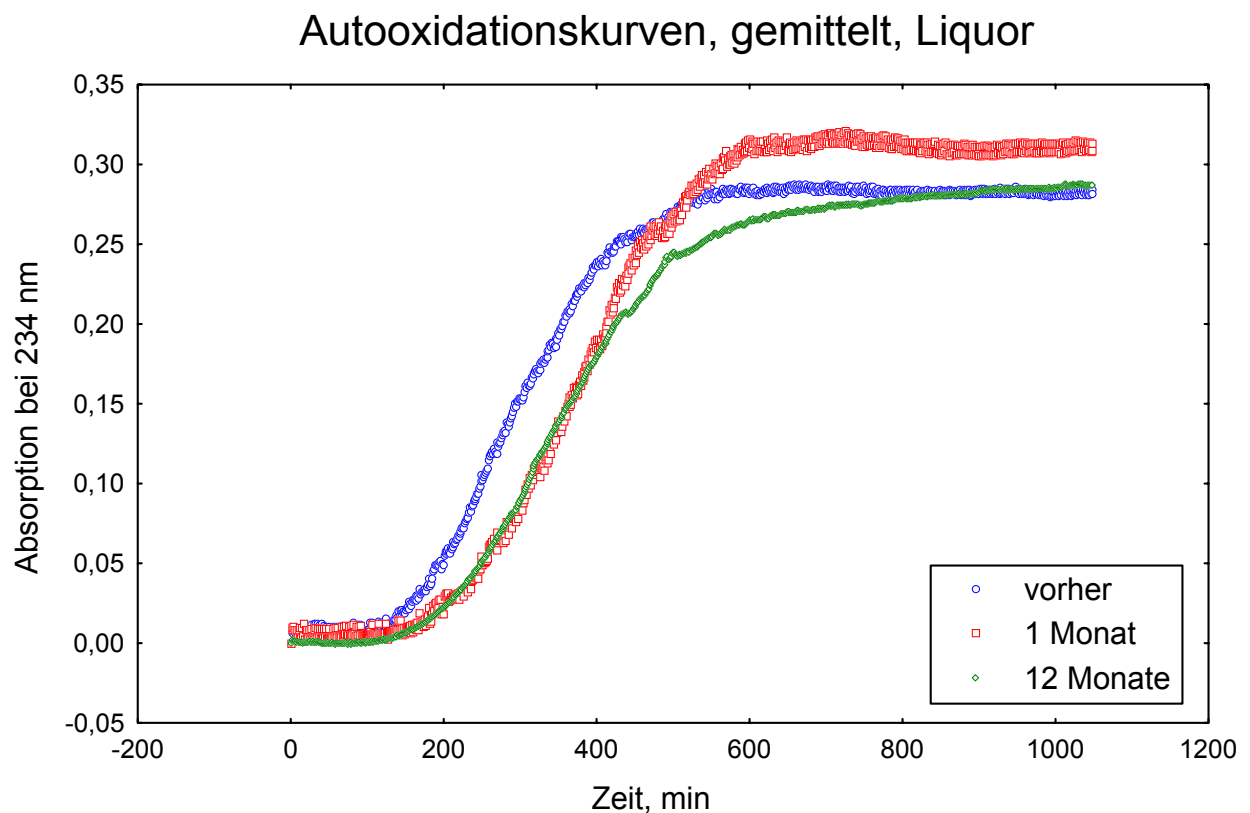
AUTO - Autooxidation

AAPH - Oxidation mit AAPH

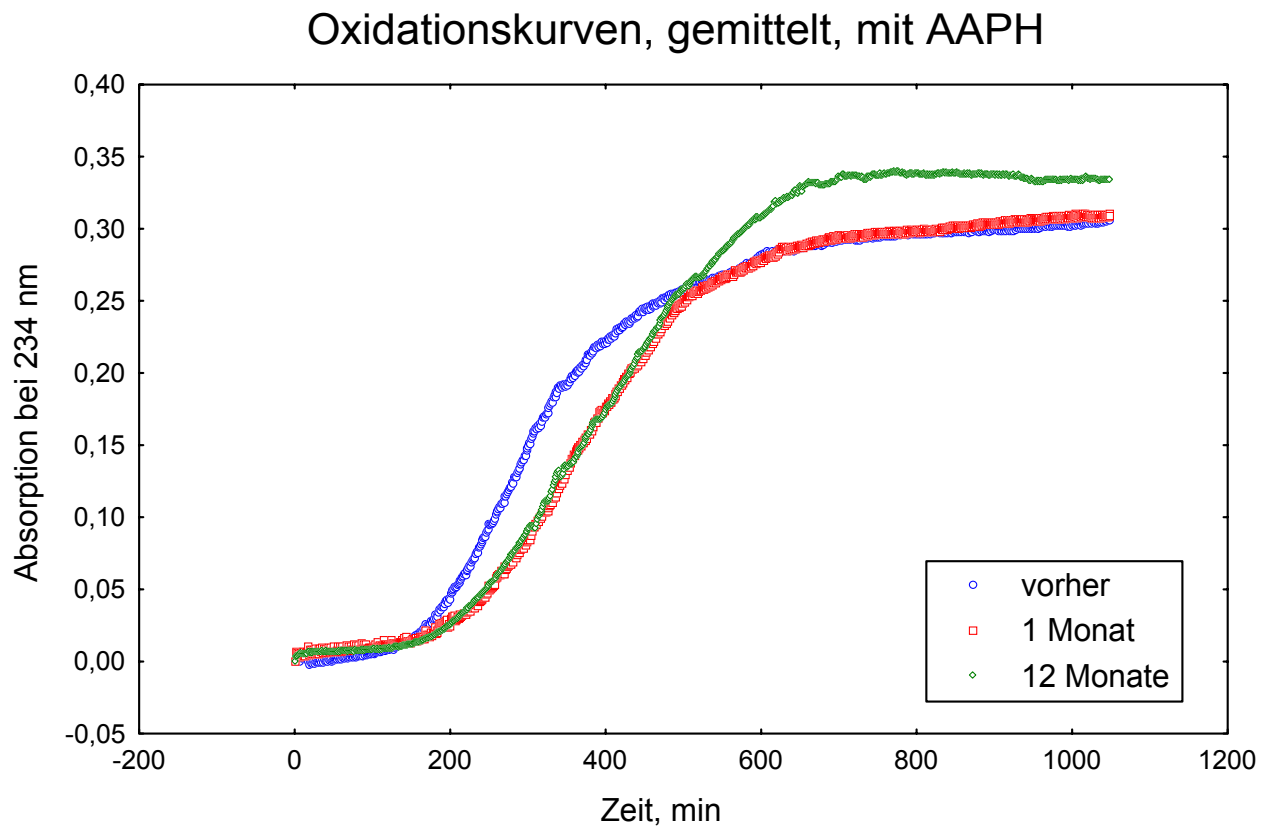
Bei der Autooxidation sind nach einem Monat Vitamingabe folgende Veränderungen eingetreten im Vergleich zum Studienbeginn. Die Lag-Phase verlängerte sich, die Oxidationskurve ist nach rechts verschoben. Die Propagationsphase verlängerte sich nur unbedeutend. Gleichzeitig verringerte sich die Geschwindigkeit, mit der Oxidationsprodukte während der Propagationsphase anfallen. Nach 12 Monaten Vitamingabe verkürzte sich die Lag-Phase wieder, sogar unter Ausgangsniveau, die Propagationsphase verlängerte sich geringfügig. Für Lag- und Propagationsphase verminderte sich die Oxidationsrate nicht-signifikant.

Für die Oxidation mit AAPH verlängert sich die Dauer der Lag-Phase nur im ersten Monat, dann fällt sie leicht zurück, für die Propagationsphase ist die Verlängerung bis zum Studienende konsistent. Die Oxidationsrate verringert sich nur bis zum Ende des ersten Monats, dann steigt sie für die Propagationsphase wieder an.

Die folgenden Abbildungen zeigen die gemittelten Oxidationskurven für die beiden Oxidationsbedingungen. Bei beiden Bedingungen sind die Kurven nach rechts verschoben, mit AAPH nicht nur nach einem Monat, sondern fortlaufend bis zum Studienende.



Die Ergebnisse stimmen mit denen von Kontush et al. (2001) überein. (Die Gabe von Vitamin E und C für einen Monat verschob die AAPH-Oxidationskurve nach rechts. Die Propagationsphase war signifikant verlängert. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Autooxidation gemacht, jedoch erreichten sie keine Signifikanz.)



5 Diskussion

Die AD ist eine immer stärker, vor allem bevölkerungspolitisch, an Bedeutung gewinnende Krankheit. Ihre Ursachen, ihr Entstehungsmechanismus sind ungeheuer komplex, seit vielen Jahren beschäftigen sich Tausende von Forschern weltweit mit ihrer Erforschung. Noch immer ist der Pathomechanismus nicht verstanden.

Es sind verschiedene Hypothesen aufgestellt, wie entweder eine Abfolge verschiedener Ereignisse AD auslösen, oder in einem ungünstigen Schauplatz grundsätzlich nicht pathologische Ereignisse einen zerstörerischen Verlauf nehmen. Die Hypothese des Einflusses oxidativen Stresses ist weitestgehend anerkannt und durch viele Arbeiten untermauert.

Viele Beobachtungen in dementen Personen bieten deutliche Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress in Gehirnen von AD-Patienten, deren Ausmaße entweder die von gesunden Personen deutlich überschreiten, beziehungsweise inadäquate antioxidative Mechanismen stattfinden.

In AD-Patienten wurden deutlich niedrigere Konzentrationen von AO in Plasma und Liquor gefunden, vor allem α -Toc und AS. Ein solcher Mangel kann grundsätzlich auf mangelhafter Einnahme, mangelhafter Aufnahme und Transport ins Wirkmilieu oder erhöhtem Verbrauch der AO beruhen. Erstere zwei erscheinen unwahrscheinlich, weil die Einnahme zumindest anamnestisch bestätigt wurde und zum anderen grundsätzlich die Einnahme von Vitamintabletten in der Folge auch zu einem Anstieg der Laborparameter führt. Ein erhöhter Verbrauch ist hingegen aus vielerlei Gründen wahrscheinlich. Im Hirn fallen Oxidationsprodukte an, umgekehrt proportional werden oxidierbare Substrate verbraucht. Regelmechanismen, die im gesunden Menschen – ganz regelhaft ablaufende – Oxidationsprozesse im Zaum halten, funktionieren eingeschränkt im AD-Patienten. Substanzen, die Initiatoren der Oxidation sind (Übergangsmetallionen wie Kupfer und Eisen) werden vermehrt gefunden. Freie Radikale, die aufgrund ihrer Schädlichkeit nur in geringem Maße im gesunden Patienten freiwerden und durch antioxidativ wirkende Substanzen oder Enzyme abgefangen werden, wer-

den im AD-Hirn verstärkt gebildet (mitochondrial, β -Amyloid) oder mangelhaft abgewehrt.

Ausgehend davon, dass oxidative Prozesse über freie Radikale als Mediatoren / Vektoren eine zentrale Rolle spielen, ist die Überlegung, therapeutisch antioxidative Substanzen einzusetzen, logisch. α -Toc und AS sind in Bezug auf Durchführbarkeit und Messbarkeit der Wirkung die zwei wahrscheinlich günstigsten AO. Ihre Beziehung zu pathologischen Vorgängen im AD-Hirn ist am stärksten durch vorangegangene Studien zu vermuten. Des weiteren liegt der hier durchgeführten gemeinsamen Gabe die Überlegung zugrunde, dass für α -Toc und AS eine Beeinflussung untereinander postuliert wurde. Neben der individuellen AO-Wirkung kann AS auch die Wirkung von α -Toc verstärken bzw. aufrechterhalten, indem es die Regenerierung von α -Toc-Radikalen unterstützt.

Eine Pilotstudie (in unserem Labor) untersuchte den Einfluss der Gabe dieser beiden Vitamine für einen Monat.

Die AD ist eine Erkrankung mit jahrelangem Verlauf, die Progredienz ist fortschreitend. In Anbetracht dessen war die begrenzte Aussagekraft der Pilotstudie bedacht. Die Studie konnte deutlich einen positiven Einfluss der Vitamingabe zeigen, zum einen die verminderten Vitaminlevel auf Normalniveau heben und damit auch in einen Zustand zurückversetzen, in dem die postulierte oxidative Schädigung nicht weiter ungebremsst stattfinden kann, sondern der Körper wieder über eine ausreichend (?) konzentrierte Gegenwehr verfügt. Nicht nur, dass oxidativer Stress in erhöhtem Maß auf das AD-Hirn wirkt, auch sind die körpereigenen Waffen weitestgehend außer Gefecht gesetzt oder zumindest dem Geschehen hilflos ausgeliefert.

Zum anderen sah man in der Studie, dass Parameter, die oxidativen Schaden modellhaft quantifizieren (Oxidationskinetik im Plasma und im Liquor), deutlich verbessert werden konnten. Nach einem Monat kann natürlich keine Aussage über den Gewinn dieser Therapie für die Patienten gemacht werden. Außerdem ist das Wesen der AD zu wenig verstanden, um eine prognostische Aussage zu machen. Man weiß zu wenig über die Mechanismen, die in einem oxidativ geschädigten Hirn ein erhöhtes Angebot von AO-Vitaminen regulieren. Kann der Körper die Vitamine bis zu einem Maß aufsättigen, der über längere Zeit o-

oxidativen Schutz bietet ? Sind die beobachteten Ergebnisse nur Resultat einer kurzzeitigen Aufsättigung lang geleerter AO-Reserven oder ist kontinuierliche Vitamingabe in der Lage, mit dieser progredienten Krankheit Schritt zu halten ? Es liegt im Wesen einer fortschreitenden Erkrankung, dass sich die Schädigung über die Jahre schneller verschlechtert. Kann Vitamingabe diesen Prozess verlangsamen, die derzeitige Geschwindigkeit nur beibehalten oder gar verbessern?

Erst eine länger anhaltende Vitamingabe kann versuchen, Antworten auf diese Fragen zu geben. Die Erforschung biochemischer Parameter im Blutplasma und Liquor wie im vorliegenden Falle kann nur eingeschränkte Urteile abgeben. Letztlich ist nicht die Besserung von Laborparametern, sondern die klinische Besserung von Patienten das Maß aller Therapieoptionen. Und dabei wird kein Medikament gesucht, welches auf Monatsbasis Besserung verspricht, sondern ein wirklich in der Praxis anwendbares, akzeptables und vor allem den Krankheitsverlauf linderndes Mittel. Vitamin E und C – aufgrund ihrer deutlichen Hinweise als stärkste Radikalfänger im Plasma und Liquor ausgewählt – können, so ihre vorteilhafte Wirkung mit begründeten und fundierten Ergebnissen belegt, einigen dieser Ansprüche gerecht werden.

Die vorliegende Studie entspricht im Studiendesign einer Verlaufsuntersuchung, in der Frage nach dem Verhalten der Oxidationsparameter nach einem Jahr beantwortet werden soll und kann. In den Betrachtungen wird von dem wahrscheinlich zu erwartenden Verlauf der Erkrankung ausgegangen. Die durchschnittliche Lebenserwartung eines AD-Patienten ab Diagnosestellung beträgt 5 bis 8 Jahre. Ein Jahr ist somit eine lange Zeit, in der deutliche Veränderungen stattfinden. Der durchschnittliche Verlust an kognitiven Leistungen, gemessen durch neuropsychologische Tests wie den MMSE beträgt 3 bis 4 Punkte pro Jahr.

Die Patienten der Studie verschlechterten sich im Schnitt um 2,2 Punkte. Hierbei fällt aber der außergewöhnlich schwere Verlauf einer Patientin ins Gewicht, die zu Beginn 12 Punkte und nach einem Jahr mit den angewendeten Tests nicht messbar war. Wahrscheinlich zielt die Therapie sowieso eher auf Patienten in einem frühen Demenzstadium, die so hoffentlich lange Zeit in ihrem normalen sozialen Umfeld integriert bleiben können. Die eben genannte Patientin fällt nicht in diese Kategorie. Ohne sie beträgt der durchschnittliche Verlust im

MMSE nur 1,2 Punkte. Vom klinischen Aspekt ist damit deutlich, dass die Patienten von der Therapie profitieren. Dies sollte in einer Fall-Kontroll-Studie näher untersucht werden. Trotz des nicht abstreitbaren Fortschritts ist dieses Ergebnis kritisch zu betrachten. In den klinischen Verlauf einer AD-Erkrankung spielen viele Faktoren ein. Das Bewusstsein, an einer Studie teilzunehmen, die Hoffnung, die jeder Einzelne möglicherweise daran knüpft und die intensivere Betreuung der Patienten (ein zusätzlicher Untersuchungstermin mit neuropsychologischen Tests, zeitintensivere Betreuung durch das Prozedere der Lumbal- und Venenpunktion) können durchaus positiv auf die psychische Verfassung des Patienten gewirkt haben.

Diese Studie konzentriert sich zunächst auf die biochemischen Parameter, die anhand der Körperflüssigkeiten der Patienten bestimmt wurden.

Oxidative Prozesse greifen den Körper an unzähligen Stellen an, und werden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, zum einen mit neurodegenerativen Prozessen wie AD und normalem Altern, zum anderen mit Atherosklerose, Emphysem und Diabetes.

Verschiedene Biomoleküle sind Zielort oxidativen Angriffs. In unserem Labor und in meiner Arbeit konzentriert sich die Forschung auf oxidativen Schaden an Lipoproteinen. Lipoproteine sind im Plasma und im Liquor in charakteristischer Zusammensetzung vorhanden, wie in zahlreichen Studien untersucht wurde. Bei einem unbehandelten AD-Patienten erwartet man eine Anhäufung von Reaktionsprodukten der Lipoperoxidation, und zwar in einem Maße, das die normaler Lipoproteine überschreitet. Gemessen werden kann das photometrisch über die Akkumulierung von Lipid-Hydroperoxiden, sowohl im Plasma [Kontush et al. 1996] als auch im Liquor [Arlt et al. 2000].

Gleichzeitig erwartet man eine Abnahme ungesättigter Fettsäuren, in erster Linie mehrfach ungesättigter Fettsäuren, die aufgrund ihrer Doppelbindungen bevorzugtes Ziel freier Radikale sind. Zunächst fällt auf, dass sowohl Cholesterin als auch die Gesamtfettsäuren im Liquor signifikant ansteigen. PUFA's fallen nicht ab, sondern steigen an. Das könnte Folge des Anstiegs der TFA sein. Deshalb die prozentuale Angabe, auch hier steigen Linoleinsäure und Arachidonsäure (als PUFA's), gleiches gilt für die MUFA's Oleinsäure und Vaccensäure. Im Plasma wurden keine Unterschiede gefunden. Das entspricht den Beobachtun-

gen anderer Gruppen. Interessanterweise wurde in einer Vergleichsstudie zwischen Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Personen signifikant erniedrigte Konzentrationen von Arachidon- und Vaccensäure gefunden [Schippling et al. 2001]. In vorliegender Studie erreichen die Konzentrationen dieser beiden ungesättigten Fettsäuren nach Vitamin-Supplementierung in Alzheimer-Patienten annähernd die Konzentrationen, die in obengenannter für nicht-demente Personen beschrieben wurden. Das ist ein Hinweis, dass möglicherweise die Vitamin-Supplementierung das bei Alzheimer-Erkrankten veränderte Fettsäuremuster wieder dem Normalzustand annähern kann. Weiterhin spricht der Anstieg von Gesamtfettsäuren und Cholesterin parallel zum Anstieg von Vitamin C und E dafür, dass eine Beziehung der Fette zu dem Vitamintransport ins Gehirn stehen. Für Cholesterin im Liquor bestehen positive Korrelationen zu Vitamin E ($r=0,62$, $p=0,000$) und zu Vitamin C ($r=0,334$, $p=0,046$). Für die Gesamtfettsäuren bestehen ebenfalls Korrelationen zu Vitamin E ($r=0,49$, $p=0,002$) und zu Vitamin C ($r=0,38$, $p=0,022$). Weitere Zusammenhänge werden gemeinsam mit den Vitaminkonzentrationen besprochen.

Im Cholesterin- und Triglycerid-Gehalt zeigen Alzheimer-Patienten keinen deutlichen Unterschied zu nicht-dementen Personen [Schippling et al. 2001; Kötter et al. 1996].

Der Einfluss von Vitamin C auf die Plasmalipide wurde anhand von 46 Veröffentlichungen in der englischsprachigen Literatur untersucht [Howard et Meyers 1995]. Es spricht vieles dafür, dass hohe Vitamin C-Konzentrationen mit einem geringeren Atherosklerose-Risiko einhergehen und dieser Effekt nicht ausschließlich durch die antioxidativen Fähigkeiten von Vitamin C, sondern auch durch eine Modifizierung der Plasmalipide erreicht wird. In der vorliegenden Studie konnten keine Korrelationen zwischen dem Vitamin C-Gehalt und dem Fettsäureprofil beobachtet werden. Vitamin C steigt über die gesamte Studiedauer an, HDL erfährt nur einen leichten Anstieg, der nicht signifikant ist und auch nicht korreliert, wie in genannter Studie beobachtet. Eine negative Korrelation zwischen Gesamtcholesterin und Vitamin C bei Männern und eine positive Korrelation bei Frauen wurden ebenfalls nicht beobachtet, Cholesterin erfährt keinen einheitlichen Anstieg wie Vitamin C. Es wurden keine anderen Korrelationen gefunden. Die Hypothese kann somit nicht gestützt werden, insofern die

gemeinsame Gabe von Vitamin C und Vitamin E überhaupt eine Vergleichbarkeit erlaubt. Möglicherweise wären ähnliche Lipid-Modifikationen zu beobachten gewesen, postuliert man einen gegenteiligen Effekt von Vitamin E.

Viele Forschergruppen untersuchten die Konzentration von Antioxidantien in Alzheimer-Patienten. Antioxidantien spielen in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung 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 [Foy et al. 1999; Jiménez-Jiménez et al. 1997; Schippling et al. 2001].

Vitamin E ist der effektivste antioxidative Schutz gegen Lipidperoxidation.

Durch die Vitamingabe gelingt es, erniedrigte Werte bei Alzheimer-Patienten wieder auf normale Konzentrationen zu heben und somit wahrscheinlich die erhöhte Lipidoxidierbarkeit bis zu einem gewissen Grade zu verringern. In einer Studie wurde die Beobachtung gemacht, dass der Vitamin E-Spiegel von gesunden Patienten nach Absetzen der Vitamingabe schnell innerhalb einer Woche wieder sank. Die Vitamingabe erfolgte nur über 21 Tage [Dieber-Rotheneder et al. 1991]. In vorliegender Studie wurde jedoch über reichlich 360 Tage supplementiert und somit ist diesem vorzeitigen Abfall vorgebeugt. Das Verhalten des erreichten Vitamin E-Spiegels nach Ende unserer Studie ist nicht abzuschätzen. Andererseits sind die Vitamin E-Spiegel nicht über die gesamte Dauer der Einnahme zu steigern, was dafür spricht, dass für Vitamin E eine Sättigung im Plasma vorliegt. Durchschnittlich fallen die Werte sogar ein wenig ab. Der Aufbau der Studie suggeriert ein Maximum nach einem Monat, danach stagniert die Konzentration beziehungsweise fällt ab. Wir können jedoch nicht sagen, wann eine Sättigung erreicht ist oder ein Konzentrationsumschlag stattfindet, da nur nach einem Monat und einem Jahr Plasma und Liquor gewonnen wurden. Möglicherweise hält die Konzentrationssteigerung über mehrere Monate an und fällt dann deutlich ab, um nach 12 Monaten die von uns gemessene Konzentration zu erreichen. Eine solche Überlegung ist jedoch unwahrscheinlich. Anhand allgemeiner Sättigungskinetik ist eher zu vermuten, dass bei Beginn der Vitamingabe zunächst eine deutliche Konzentrationssteigerung eintritt, zumal die Werte vor

Vitamingabe unter dem Normalniveau lagen, und nach Erreichen des Normalniveaus eine nur geringe Steigerung bis zur Aufsättigung folgt. Ist jedoch selbst bei einer progredienten Erkrankung wie der Alzheimer-Erkrankung, bei der man über einen längeren Zeitraum wie einem Jahr eine zunehmende Oxidierbarkeit von Lipoproteinen und demzufolge zunehmenden Verbrauch von Antioxidantien für wahrscheinlich hält, trotz allem eine in etwa gleichbleibend hohe Konzentration von Vitamin E zu sehen, so spricht das für eine effiziente Zufuhr von Vitamin E durch die Supplementierung.

Im Plasma befindet sich Vitamin E wahrscheinlich hauptsächlich in Lipoproteinen. Der Transport findet in LDL statt. Pro LDL liegen bei gesunden nicht-supplementierten Personen nur 3 bis 15 Moleküle Vitamin E vor. Das Verhältnis konnte in dieser Studie zugunsten des Vitamin E erhöht werden. Es besteht die Vermutung, dass der Vitamin E-Gehalt in LDL hauptsächlich von anderen Faktoren beeinflusst wird als der Vitamin E-Konzentration im Plasma [Ziouzenkova et al. 1996]. Eine andere Studie vermutet einen Zusammenhang zwischen der Vitamin E-Sekretion und dem Cholesterin-Metabolismus, da beobachtet wurde, dass sich die Sekretion von Vitamin E signifikant durch 25-Hydroxycholesterol inhibieren lässt [Traber et Arai 1999].

Entscheidender ist die Vitamin E-Konzentration im Zentralen Nervensystem, denn dort finden die pathologischen Vorgänge der Alzheimer-Erkrankung statt. Die Vitamingabe bewirkt eine hochsignifikante Steigerung der Vitamin E-Konzentration im Liquor, sowohl als Absolutwerte als auch als Lipidstandardisierte Werte. Diese Beobachtung ist nur nach einem Monat zu machen, bis zum Ende des Jahres fallen die Lipidstandardisierten Vitamin E-Konzentrationen auf Ausgangsniveau zurück. Zur Betrachtung dient ein Vergleich mit der Parkinson-Erkrankung. Deren Vitamin E-Spiegel sind normal bis gering erniedrigt [Dexter et al. 1992; Molina et al. 1997]. Trotz allem wurden durch Vitamin-Supplementierung (Vitamin E und C) therapeutische Erfolge erzielt, der Beginn einer L-Dopa-Therapie konnte um 2,5 Jahre hinausgezögert werden [Fahn et al. 1991]. Eine über durchschnittlich 322 Tage laufende Studie mit Vitamin E-Supplementierung bei Parkinson-Patienten fand einen signifikanten Anstieg der Vitamin E-Konzentrationen im Liquor, und eine positive Korrelation der Einnahmedauer mit der Liquorkonzentration [DATATOP-Studie

1993]. Solche Ergebnisse wurden bei den in vorliegender Studie untersuchten Alzheimer-Patienten nicht gemacht, möglicherweise liegt der Grund in der Andersartigkeit der Alzheimer'schen Erkrankung. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre ein eventuell stärker progredienter Charakter der Alzheimer-Erkrankung, der ein kontinuierliches Ansteigen der Vitamin E-Konzentrationen verdeckt.

Die erniedrigten Vitaminkonzentrationen im Liquor können einerseits für einen hohen Verbrauch, andererseits für veränderte Transportmechanismen sprechen. Die Beziehung zwischen erhöhtem Verbrauch von Antioxidantien und erhöhter Lipidperoxidation im Gehirn bei der Alzheimer-Krankheit ist weitestgehend gesichert. Das erklärt jedoch noch nicht die Frage nach dem Transport der Vitamine aus dem Plasma ins Gehirn. Noch fehlen grundlegende Bausteine zum Verständnis des Transports von Vitamin E ins ZNS. Im Plexus choroideus wird die Ventrikelflüssigkeit gebildet, die einem Ultrazentrifugat des Plasmas ähnelt. Es ist vorstellbar, dass nur sehr wenig Vitamin E auf diesem Wege ins ZNS gelangt. Lipoprotein-Aktivität und LDL-Rezeptoren in Mikrogefäßen des Gehirns sind nachgewiesen. Dies spricht für eine Beteiligung ähnlicher Mechanismen im Gehirn wie im Plasma. Eine Forschergruppe vermutet eine Einschränkung und Regulierung der Vitamin E-Passage in beide Richtungen durch die kapillären endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke [Clément et Bourre, 1997]. Eine andere Gruppe vermutet eine Beeinträchtigung der Vitamin E-Aufnahme ins Gehirn, wobei es in LDL zu einem spezifischen Rezeptor auf dem kapillären Endothelium transportiert wird [Toghi et al., 1994]. Möglicherweise liegt der hauptsächliche Faktor für die hohen Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Liquor in der Proteinbindungsfähigkeit [Vatassery et al., 1991]. In ihren Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen Vitamin E-Konzentration und den Gesamtprotein- und -albumin-Konzentrationen. Somit ist es wahrscheinlich, dass Vitamin E gemeinsam mit den Plasmaproteinen in den Liquor übertritt. Wird die Proteinkonzentration im Liquor durch vermehrten Übertritt von Plasmaproteinen erhöht, folgt daraus ebenfalls die erhöhte Vitamin E-Konzentration im Liquor. Geringe Mengen Vitamin E können aus der Extrazellulärflüssigkeit des Hirns selbst stammen, da diese mit dem Liquor im Gleichgewicht steht. Auffallend ist der Unterschied der Konzentrierung des fettlöslichen Vitamin E im Vergleich zu wasserlöslichen Vitaminen wie Ascorbinsäure (anschließend diskutiert) und Folsäure. Sie sind im Liquor höher konzentriert als im Plasma.

In der vorliegenden Studie ist die deutliche positive Korrelation zwischen Vitamin E und Cholesterin im Liquor auffallend ($r = 0,62$, $p = 0,000056$). Liquor weist eine Konzentration von Lipiden von circa 10-20 mg/l auf, das entspricht etwa 0,2 % derer im Serum. Die Erhöhung der Vitamin E-Konzentration, also der verstärkten Vitamin E-Aufnahme in den Liquor, läuft parallel zur Erhöhung von Cholesterin und Gesamtfettsäuren. Die erhöhte Abwanderung von Lipiden aus dem Blut in den Liquor macht sich für die Konzentration im Blut nicht bemerkbar, im Liquor jedoch, wo die geringe Konzentration so sensibel auf einen Zustrom reagiert, schon. Ungeklärt ist nach wie vor, ob ein erhöhtes Vitamin E-Angebot im Blut die verstärkte Abwanderung von Lipoproteinen in den Liquor antreibt, oder ob ein bislang unbekannter Faktor eine erhöhte Aufnahme von Lipoproteinen über die Blut-Liquor-Schranke bewirkt, und Vitamin E nur infolgedessen in Begleitung letztendlich die Konzentration im Gehirn erhöht. Vitamin E im Liquor korreliert positiv mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren ($r = 0,49$, $p = 0,002$) und einfach ungesättigten Fettsäuren ($r = 0,49$, $p = 0,002$) im Liquor. Das kann bedeuten, dass ein erhöhtes Angebot an antioxidativ wirkendem Vitamin E die ungesättigten Fettsäuren schützt. Je mehr Vitamin E vorhanden ist, desto mehr ungesättigte Fettsäuren werden vor der Oxidation bewahrt und sind somit durch unsere Labormethoden nachweisbar.

Cholesterin steigt weniger schnell an als Vitamin E, das führt dazu, dass Vitamin E in Bezug auf die Lipide nach einem Monat relativ stärker konzentriert ist. Nach 12 Monaten ist die nachweisbare Menge Vitamin E zwar gleich hoch, aber auch die Lipide relativ stärker konzentriert, so dass das Verhältnis Vitamin E zu Lipide nach 12 Monaten wieder dem vor Beginn der Studie entspricht.

Der relative Konzentrationszuwachs nach einem Monat ist vorstellbar durch die anfänglich unterschiedlich erniedrigten Konzentrationen. Das ziemlich schlagartige Auffüllen des Vitamin E-Spiegels wird nicht so schnell durch den Verbrauch ausgeglichen, deshalb überwiegt zunächst Vitamin E. Man könnte vermuten, dass nach 12 Monaten der positive Effekt wieder aufgehoben ist, da ja das Verhältnis Vitamin E zu Cholesterin dem Ausgangswert entspricht. Ich vermute jedoch, dass der unbehandelte Verlauf folgender wäre, dass das Verhältnis kontinuierlich zuungunsten des Vitamin E abfällt. Das beobachtete Er-

gebnis ist somit ein Erfolg in der antioxidativen Therapie der Alzheimer-Erkrankung.

Es ist unzureichend, nur Vitamin E zu betrachten. Vitamin E steht mit anderen Antioxidantien im Wechselspiel, vor allem mit Vitamin C. Das bei der Radikalbindung aus α -Tocopherol entstehende α -Tocopherol-Radikal wird vermutlich zum größten Teil durch Ascorbinsäure regeneriert. Es entsteht ein Ascorbinsäure-Radikal, welches jedoch nicht sehr reaktiv ist. Wahrscheinlich wird Ascorbinsäure über das Glutathion-System ständig regeneriert. Gesichert ist, dass an Orten oxidativer Schädigung netto Vitamin C verloren geht. Alzheimer-Patienten haben erniedrigte Vitamin C-Konzentrationen [Foy et al., 1999; Schippling et al., 2000]. Die Vitamingabe kann dieses Missverhältnis sehr effektiv beheben und Vitamin C zurück auf hochnormale Werte heben. Die Konzentrationssteigerung im Plasma ist gewaltig. Schon im ersten Monat schnellte die Konzentration auf über das Doppelte hoch. Der Plasma-Vitamin C-Gehalt unterliegt starken Schwankungen, so ist zum Beispiel ein bis zwei Stunden nach nutritiver Vitamin C-Aufnahme ein Peak im Plasma zu verzeichnen [Benzie et al., 1999]. Wir haben leider keine Daten, wann die letzte Vitamineinnahme vor der Blutentnahme stattfand. In folgenden Studien sollte darauf geachtet werden.

Wie auch für andere Antioxidantien stellt die Plasmakonzentration eher die kurzfristige Lage dar, während die Konzentration im Liquor stärkere Aussagekraft bezüglich des Langzeit-Vitaminspiegels hat und stabiler gegenüber nutritiven Schwankungen ist.

Im Liquor ist Vitamin C drei- bis fünffach erhöht, während alle fettlöslichen Vitamine dort hundert- bis fünfhundertfach niedriger sind als im Plasma. Es ist nicht ganz klar, welche Rolle die hohe Ascorbinsäure-Konzentration im Liquor spielt. Während im Blut die Zellen ständig erneuert werden, genügen dort offensichtlich auch geringere Mengen zum Schutz der Membranen vor Schaden durch freie Radikale. Im Gehirn ist das nicht der Fall, viele Zellen sind postmitotisch. Die Beseitigung schädigender Agentien spielt eine umso wichtigere Rolle. Das könnte die hohen Vitamin C-Konzentrationen im Liquor erklären. Es wird jedoch vermutet, dass es daneben auch an weitere Funktionen gebunden sein könnte [Lönnrot et al., 1996]. Für Vitamin C wird eine Funktion als Neuromodulator angenommen, der die Freigabe von Neurotransmittern erleichtert und die

Neurotransmitterbindung an Rezeptoren verhindert. Ähnlich wie bei Vitamin E im Liquor findet man nach dem ersten Monat keine weitere Steigerung. Auch für Vitamin C nimmt man an, dass es sättigbar ist [Reiber et al., 1993]. Das Verhältnis von Liquor- zu Plasmakonzentration fällt zunehmend. Der Transport von Vitamin C aus dem Plasma in den Liquor ist weitestgehend erforscht. Es tritt hauptsächlich durch aktiven Transport im Plexus choroideus in den Liquor über [Rice et al., 2000]. Es finden sich regionale Unterschiede in der Konzentrierung, zum Beispiel spiegelt im Vergleich zwischen Neuronen und Gliazellen die etwa zehnfach höhere Konzentrierung in Neuronen den oxidativen Metabolismus beider Zellarten wider [Rice et al., 2000].

Im Plasma wirkt neben genannten Vitamin C und E als weiteres wichtiges Antioxidanz Ubichinol-10, dessen Wirkmechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist. Es wirkt entweder selbst als Radikalfänger, über die Regenerierung von Vitamin E oder über beide Wege. Da bei der Lipoperoxidation Ubichinol-10 schneller verschwindet als die Tocopherole, wird die Regenerierung von Vitamin E favorisiert [Stocker et al., 1991].

Die reduzierte Form Ubichinol-10 fällt signifikant, was im Zuge der stattfindenden Oxidation und dem postulierten Verbrauch der Antioxidantien verständlich erscheint. Das Verhältnis zwischen reduzierter und oxidierte Form fällt zugunsten der reduzierten Form. Im Liquor sind nur sehr geringe Mengen Ubichinol-10 vorhanden. Eine Supplementierung mit Ubichinol-10 konnte den Liquorspiegel nicht steigern, was erstaunlich ist, da man aufgrund der Lipophilie des Antioxidanz annahm, Ubichinol-10 könne die Blut-Liquor-Schranke leicht überwinden [Lönnrot et al., 1996].

Carotinoide sind in Pflanzen wichtige Antioxidantien, wobei ein solcher Zusammenhang für den menschlichen Organismus fraglich ist. Im Vergleich zwischen Alzheimer-Patienten und nicht-dementen Patienten fand eine Studie für α -Carotin verminderte Konzentrationen, nicht so für β -Carotin [Schippling et al., 2000]. Bei der in vorliegender Studie durchgeführten Vitaminsupplementierung wurden für beide Carotinoide keine nennenswerten Konzentrationsänderungen beobachtet. Da sie hauptsächlich von LDL getragen werden, erschließt auch hier erst die Standardisierung auf Lipide eine Senkung der Konzentration von β -Carotin im Plasma. Trotz allem bleibt zu vermuten, dass eine Anreicherung mit

diesen Substanzen keinen spürbar erhöhten Schutz gegenüber oxidativen Prozessen darstellt, auch wenn β -Carotin in der Konzentration abfällt und dieses Vitamin in die Supplementierungsempfehlungen für einen gesicherten Vitaminbedarf im Alter aufgenommen ist. Dosis-abhängig, bei genügend großen Mengen von α -Tocopherol, schützt α -Tocopherol β -Carotin vor Autooxidation. Dass β -Carotin α -Tocopherol schützt, ist unwahrscheinlich aufgrund der schwächeren Fähigkeit von β -Carotin, als Wasserstoff- oder Elektronen-Donator zu wirken [Palozza, Krinsky, 1992]. α -Tocopherol und β -Carotin üben in Lösung einen additiven Effekt auf die Oxidation aus, wenn auch nur einen gering stärkeren als die Summe ihrer Einzelwirkungen auf Oxidationshemmung in Membranen [Niki et al., 1995].

Als weiteres lipophiles Antioxidanz wurde γ -Tocopherol im Plasma bestimmt. γ -Tocopherol beträgt nur etwa ein Zehntel der biologischen Aktivität von α -Tocopherol, jedoch scheint es wichtig zu sein in Bezug auf beider Transportmechanismen. Durch die Nahrung nehmen wir zehnfach so viel γ -Tocopherol wie α -Tocopherol auf, als Vitamin E-Gehalt findet man im Plasma aber hauptsächlich α -Tocopherol. Es wurde beschrieben, dass große Mengen an α -Tocopherol γ -Tocopherol vom Plasma in die Galle verdrängen. Weiterhin wurde die Überlegung geäußert, dass der Quotient aus α -Tocopherol zu γ -Tocopherol ein Indikator für die Nahrungsaufnahme von α -Tocopherol sein könnte und somit hilfreich, um die Compliance bei klinischen Studien zu überprüfen [Morrissey et Sheeny, 1999]. Weitere Validierung der Hypothese ist erforderlich.

Die Konzentration von γ -Tocopherol nimmt signifikant ab. Das verläuft parallel zur Vitamin E-Supplementierung, wie schon in anderen Studien festgestellt [Dieber-Rotheneder et al., 1991]. Die abfallenden α -Tocopherol-Konzentrationen nach Studienende wurden von wieder ansteigenden γ -Tocopherol-Konzentrationen begleitet.

Die bisher geführten Betrachtungen von Lipidzusammensetzung und Antioxidantien-Gehalt in Plasma und Liquor und dessen Veränderung als Reaktion auf die Vitamin E- und C-Supplementierung leiten alle zur abschließenden Beurteilung der eigentlichen Lipidperoxidation. Die Therapie zielt darauf ab, an dieser Stelle bei Alzheimer-Erkrankten eine Verlangsamung oder Verzögerung zu be-

wirken und damit möglicherweise günstig auf den Krankheitsverlauf einzuwirken. Im Plasma findet eine nicht-signifikante Steigerung der Oxidationsrate statt, sowohl in AAPH-getriggelter als auch in Autooxidation. Die Steigerung ist im ersten Monat stärker als in jedem der folgenden Monate der Studie.

Zu bedauern ist die mangelnde Vergleichbarkeit der Oxidationswerte mit Alzheimer-Patienten, die keine Vitaminsupplementierung erfahren, deren Oxidationsvorgänge wahrscheinlich - dem Wesen dieser progredienten Krankheit nach - im Verlauf eines ganzen Jahres an Schwere zunehmen. Es wäre von großer Bedeutung zu wissen, welches die zu erwartende Beschleunigung der Oxidationsgeschwindigkeit einer Vergleichsgruppe über den gleichen Zeitraum ist, um hier vorliegende Ergebnisse objektiver beurteilen zu können. Es wurden in unserem Labor AD-Plasma und Plasma gesunder nicht-dementer Personen untersucht und dabei die Oxidationsraten unter beiden Oxidationsbedingungen signifikant erhöht gefunden [Schippling et al. 2000]. Nach einmonatiger Gabe von Vitamin E und C wurden bei AD-Patienten signifikant erniedrigte Autooxidationsraten gefunden; weder bei der Oxidation mit AAPH noch bei Patienten, die nur Vitamin E einnahmen, wurde eine signifikante Veränderung der Oxidationsgeschwindigkeiten gesehen [Kontush et al. 2001].

Die vielen anderen Hinweise auf die Effektivität der Therapie lassen stark vermuten, dass die beobachtete schwache Steigerung im Vergleich zur wahrscheinlich starken Steigerung ohne Antioxidantien-Supplementierung als bemerkenswerter Erfolg zu bewerten ist. Unterstützt wird diese Hypothese, wie eingangs erwähnt, durch eine positive Korrelation mit oxidierbarem Substrat, vor allem ungesättigten Fettsäuren, und eine negative Korrelation mit antioxidativ wirkenden Substanzen.

Auch hier ist die Oxidation im Liquor entscheidender, da sie näher am Ort des Geschehens der Alzheimer-Erkrankung ist.

Die Beobachtungen legen nahe, Plasma und Liquor als separate Kompartimente zu betrachten und nicht vom Geschehen im Plasma auf das im Liquor zu schließen.

Man kann davon ausgehen, dass die Oxidierbarkeit der Lipoproteine im Liquor bei AD-Patienten signifikant höher ist. Geschlossen wurde das aus einer stark

verkürzten Lag-Phase und einer stark erhöhten initialen Oxidationsgeschwindigkeit [Schippling et al., 2000].

In vorliegender Studie bewirkt die Supplementierung mit Vitamin C und E eine Entwicklung, die für einen effektiven Schutz spricht. Die Autooxidation läuft langsamer ab (Time 1 und 2 nach einem Monat, Time 2 nach 12 Monaten verlängert) und die Oxidationsraten sind vermindert. Wie andere Gruppen feststellten, haben Antioxidantien starken Einfluss auf die Oxidationskinetik der Lipoproteine.

Ascorbinsäure ist das zuerst verwendete Antioxidanz. Solange Ascorbinsäure vorhanden ist, findet weder eine nennenswerte Akkumulierung von Oxidationsprodukten noch Verbrauch anderer Antioxidantien statt. Ascorbinsäure regeneriert das α -Tocopherol-Radikal, wobei dessen Radikalfänger-Potential erhalten bleibt und die oxidative Auseinandersetzung der Lokalisation von Ascorbinsäure entsprechend in die wässrige Phase verlegt ist. Ascorbinsäure wirkt außerdem selbst als Radikalfänger.

Ungeachtet der Anwesenheit von Vitamin E beginnt bei völligem Verbrauch von Vitamin C die Propagationsphase, sprich die Anhäufung von Oxidationsprodukten. α -Tocopherol allein ist offensichtlich nicht in der Lage, die Lipide ausreichend vor Oxidation zu schützen, nachdem Ascorbinsäure aufgebraucht wurde. Zu erwarten wäre durch den Schutz durch Vitamin E eine nach rechts verschobene und abgeflachte Oxidationskurve. In einer Studie wurde Linearität zwischen Oxidationsresistenz und Vitamin E-Gehalt der LDL gezeigt [Dieber-Rotheneder et al., 1991]. In vorliegender Studie verbessert sich die Kinetik in erhoffter Art und Weise nach einem Monat. Eine Ausnahme bildet die Dauer der Lag-Phase, die sich signifikant verkürzt. Vitamin C steigt jedoch im Liquor weiterhin an, kann also nicht primär dafür verantwortlich sein. Vitamin E allerdings fällt ab, parallel zur beobachteten verkürzten Lag-Phase. Es konnte beobachtet werden, dass Vitamin E die Lag-Phase verlängert [Arlt et al., 2000]. Die Beobachtungen könnten vergleichbare sein, zumal hier Vitamin E im Liquor und die Dauer der Lag-Phase positiv korrelieren.

Es stehen Antioxidantien und oxidierbares Substrat in engem Wechselspiel. Möglicherweise werden schützende Effekte der Antioxidantien verdeckt durch gleichzeitig mehr Substrat zur Oxidation. Ein Beispiel ist Arachidonsäure. Die

Konzentration steigt im Liquor signifikant an, die Oxidationskinetik reagiert in der Weise, dass hohe Arachidonsäure-Spiegel mit einer kurzen Lag-Phase korrelieren (in der Oxidation mit AAPH außerdem mit einer erhöhten Oxidationsrate in der Propagationsphase). Eine höhere Konzentration an oxidierbaren Fettsäuren erfordert verständlicherweise eine stärkere antioxidative Präsenz.

Als Schlussfolgerung kann gesagt werden, dass die Supplementierung mit Vitamin E und C erfolgreich verläuft. Die Erwartungen müssen dem Wesen der Krankheit angemessen werden. Entscheidend sind die verbesserte Oxidationskinetik der Autooxidation, Vitamin E- und C-Konzentrationen, die zurück auf hochnormale Werte gehoben wurden und aus Sichtweise der Patienten eine kognitive Verschlechterung, die deutlich milder abläuft als die durchschnittliche. Anzunehmen ist, dass nach Ende der Studie die Vitaminkonzentrationen kontinuierlich abnehmen und mindestens auf das Ursprungsniveau zurückfallen. Die Krankheit schreitet fort, oxidative Prozesse finden unaufhaltsam statt, Antioxidantien werden verbraucht, und der Nachschub aus der Nahrung kann diese Defizite nicht ausgleichen. Die Daten der vorliegenden Studie unterstützen die Hypothese, dass eine langfristige Gabe von Vitamin C und E sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken kann. Um dies aber weiter untermauern zu können, sind weitere Studien, insbesondere Fall-Kontroll-Studien nötig. Die Therapie mit Vitaminen E und C ist aus meiner Sicht auf Dauer zu empfehlen, aufgrund der wahrscheinlich positiven Wirkung und der Nebenwirkungsarmut und da es noch keine andere wirksame Therapie gibt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden 10 Alzheimer-Patienten über ein Jahr mit Vitamin E und C supplementiert. Dadurch werden hochnormale Vitaminspiegel, eine verbesserte Oxidationskinetik, sowie eine mildere kognitive Verschlechterung beobachtet.

Die erniedrigten Vitaminwerte werden auf normale beziehungsweise hochnormale Konzentrationen gehoben. Der Vitamin E-Spiegel im Plasma unterliegt einer Sättigung. Im Liquor wird Vitamin E nach einem Monat hochsignifikant gesteigert, der scheinbare Abfall bis Ende des Jahres auf Ausgangsniveau ist möglicherweise Ausdruck der starken Progredienz der Erkrankung, die einen kontinuierlichen Anstieg verdeckt.

Vitamin E korreliert positiv mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren, und kann somit einen Schutz darstellen.

Die Therapie zielt auf eine Verlangsamung oder Verzögerung der Lipidperoxidation. Im Plasma wird eine nicht-signifikante Steigerung der Oxidationsrate beobachtet, die jedoch im Vergleich zu einer wahrscheinlich starken Steigerung ohne Antioxidantiengabe als Erfolg zu werten ist. Im Liquor wird eine langsamer ablaufende Autooxidation mit verminderten Oxidationsraten beobachtet. Die Anwesenheit von Vitamin C schützt vor Anhäufung von Oxidationsprodukten und Verbrauch anderer Antioxidantien. Vitamin E bewirkt eine nach rechts verschobene und abgeflachte Oxidationskurve.

Kognitiv zeigen die Patienten im MMSE nur einen durchschnittlichen Verlust von 1,2 Punkten pro Jahr.

Unbehandelt erwartet man eine Anhäufung von Reaktionsprodukten der Lipidperoxidation und eine Abnahme ungesättigter Fettsäuren. Diese steigen im Liquor aber an, im Plasma werden keine Unterschiede gefunden. Der Anstieg von Gesamtfettsäuren und Cholesterin im Liquor parallel zum Anstieg von α -Tocopherol und Ascorbinsäure spricht für eine Beziehung der Fette zum Vitamintransport ins Gehirn. Es bestehen positive Korrelationen.

Diese Daten implizieren, daß möglicherweise eine langfristige Vitamingabe zu empfehlen ist, doch sollte anhand Fall-Kontroll-Studien eine Verifizierung dieser Daten angestrebt werden.

7 Literaturverzeichnis

Aebischer, C.-P., Schierle, J., Schüep, W. (1999) Simultaneous Determination of Retinol, Tocopherols, Carotene, Lycopene, and Xanthophylls in Plasma by Means of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Methods in Enzymology* 299, 348-362

Agbayewa, M.O., Bruce, V.M., Siemens, V. (1992) Pyridoxine, Ascorbic Acid and Thiamine in Alzheimer and Comparison Subjects. *Ca. J. Psychiatry* 37, 661-662

Arlt, S., Finck, B., Beisiegel, U., Kontush, A. (2000) Time-course of Oxidation of Lipids in Human Cerebrospinal Fluid In Vitro. *Free Rad. Res.* 32, 103-114

Behl, C., Davis, J., Cole, G., Schubert, D. (1992) Vitamin E Protects Nerve Cells from Amyloid β Protein Toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186, 944-950

Benzie, I. (1999) Vitamin C: prospective functional markers for defining optimal nutritional status. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 469-476

Biesalski, H., Schrezenmeir, J., Weber, P., Weiß, H. (1997) Vitamine – Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York

Bjørneboe, A., Bjørneboe, G.-E., Drevon, C. (1990) Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. *Journal of Nutrition* 120, 233-242

Bracco, L., Piccini, C., Amaducci, L. (1998) Rate of Progression of Mental Decline in Alzheimer Disease: Summary of European Studies. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 12, 347-355

Christen, Y. (2000) Oxidative Stress and Alzheimer disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 612S-629S

Clément, M., Bourre, J.-M. (1997) Graded dietary levels of RRR- γ -Tocopherol induce a marked increase in the concentration of α - and γ -Tocopherol in nervous tissues, heart, liver and muscle of vitamin-E-deficient rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1334, 173-181

Dexter, D.T., Ward, R.J., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Peters, T.J., Jenner, P., Marsden, C.D. (1992) α -Tocopherol Levels in Brain Are Not Altered in Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* 32, 591-593

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

- Dieber-Rotheneder, M., Puhl, H., Waeg, G., Striegl, G., Esterbauer, H. (1991) Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. *Journal of Lipid Research* 32, 1325-1332
- Engelhardt, M., Geerlings, M., Ruitenberg, A., van Swieten, J., Hofman, A., Witteman, J., Breteler, M. (2002) Dietary Intake of Antioxidants and Risk of Alzheimer Disease. *JAMA* 287 /24, S.3223-3229
- Ernster, L., Forsmark-Andrée, P. (1993) Ubiquinol_ an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin. Investig.* 71, S60-S65
- Esterbauer, H., Jürgens, G., Quehenberger, O., Koller, E. (1987) Autooxidation of human low density lipoproteins: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *Journal of Lipid Research* 28, 495-507
- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder (1989) Continuous Monitoring of in vitro Oxidation of Human Low Density Lipoprotein. *Free Rad. Res. Comms.* 6, 67-75
- Fahn, S. (1992) A Pilot Trial of High-dose Alpha-Tocopherol and Ascorbate in Early Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* 32, S128-S132
- Finck, B., Kontush, A., Commentz, J., Hübner, C., Burdelski, M., Kohlschütter, A. (1999) High-Performance Liquid Chromatography-Coulometric Electrochemical Detection of Ubiquinol 10, Ubiquinone 10, Carotenoids, and Tocopherols in Neonatal Plasma. *Methods Enzymol.* 299, 341-348
- Förstl, H. (1997) *Lehrbuch der Gerontopsychiatrie*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Foy, C.J., Passmore, A.P., Vahidassr, M.D., Young, I.S., Lawson, J.T. (1999) Plasma chain-breaking antioxidants in Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease. *Q J Med.* 92, 39-45
- Frei, B., England, L., Ames, B. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6377-6381
- Gutteridge, J., Halliwell, B. (1994) *Antioxidants in Nutrition, Health and Disease*. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo
- Halliwell, B. (1995) Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 670S-7S

Heidrich, A., Rösler, M., Riederer, P. (1997) Pharmakotherapie bei Alzheimer-Demenz: Therapie kognitiver Symptome – neue Studienresultate. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 65, 108-121

Herold, Gerd (2000) *Innere Medizin*. Köln

Howard, P., Meyers, D. (1995) Effect of Vitamin C on plasma lipids. *The Annals of Pharmacotherapy* 29, 1129-36

Irizarry, M., Hyman, B. (2001) Alzheimer Disease Therapeutics. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60, 923-928

Jiménez-Jiménez, F.J., de Bustos, F., Molina, J.A., Benito-León, J., Tallón-Barranco, A., Gasalla, T., Ortí-Pareja, M., Guillamón, F., Rubio, J.C., Arenas, J., Enríquez-de-Salamanca, R. (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 104, 703-710

Jiménez-Jiménez, F.J., de Bustos, F., Molina, J.A., de Andrés, C., Gasalla, T., Ortí-Pareja, M., Zurdo, M., Porta, J., Castellano-Millán, F., Arenas, J., Enríquez-de-Salamanca, R. (1998) Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* 249, 65-67

Kagan, V., Serbinova, E., Forte, T., Scita, G., Packer, L. (1992) Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 33, 385-397

Kontush, A., Beisiegel, U. (1999) Measurement of Oxidizability of Blood Plasma. *Methods of Enzymology* 299, 35-49

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

Kontush, A., Mann, U., Arlt, S., Ujeyl, A., Lührs, C., Müller-Thomsen, T., Beisiegel, U. (2001) Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 0000-0000

Kontush, A., Meyer, S., Finck, B., Kohlschütter, A., Beisiegel, U. (1996) α -Tocopherol as a Reductant for Cu(II) in Human Lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 11106-11112

Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S., Beisiegel, U. (2001) Amyloid- β is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 119-128

Koolman, J., Röhm, K.-H. (1998) Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

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

Lockhart, B.P., Benicourt, C., Junien, J.-L., Privat, A. (1994) Inhibitors of Free Radical Formation Fail to Attenuate Direct β -Amyloid₂₅₋₃₅ Peptide-Mediated Neurotoxicity in Rat Hippocampal Cultures. *Journal of Neuroscience Research* 39, 494-505

Lönnrot, K., Metsä-Ketelä, T., Molnár, G., Ahonen, J.-P., Latvala, M., Peltola, J., Pietilä, T., Alho, H. (1996) The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and csf total antioxidant capacity. *Free Radical Biology & Medicine* 21, 211-217

Losonczy, K., Harris, T., Havlik, R. (1996) Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all-cause and coronary heart disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 64, 190-6

Makasi, K.H., Losonczy, K.G., Izmirlian, G., Foley, D.J., Ross, G.W., Petrovitch, H., Havlik, R., White, L.R. (2000) Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology* 54, 1265-1272

Markesbery, W. (1997) Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology & Medicine* 23, 134-147

Markesbery, W. (1999) The Role of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Arch. Neurol.* 56, 1449-1452

McGrath, L.T., McGleenon, B.M., Brennan, S., McDoll, D., McIlroy, S., Passmore, A.P. (2001) Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde. *QJM* 94(9): 485-90

Meydani, M. (1995) Vitamin E. *The Lancet* 345, 170-175

Molina, J.A., de Bustos, F., Jiménez-Jiménez, F.J., Benito-León, J., Ortí-Pareja, M., Gasalla, T., Tallón-Barranco, A., Navarro, J.A., Arenas, J., Enríquez-de-Salamanca, R. (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 104, 1287-1293

Montine, T., Montine, K., Swift, L. (1997) Central Nervous System Lipoproteins in Alzheimer's Disease. *Am. J. Pathol.* 151, 1571-1575

- Morris, M., Beckett, L., Scherr, P., Hebert, L., Bennett, D., Field, T., Evams, D. (1998) Vitamin E and Vitamin C Supplement Use and Risk of Incident Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 12, 121-126
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A. (1999) Optimal nutrition: vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society* 58, 459-468
- Mulder, M., Ravid, R., Swaab, D.F., de Kloet, E.R., Hassdijk, E.D., Julk, J., van der Boom, J., Havekes, L.M. (1998) Reduced Levels of Cholesterol, Phospholipids, and Fatty Acids in Cerebrospinal Fluid of Alzheimer Disease Patients Are Not Related to Apolipoprotein E4. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 12, 198-203
- Nedoschill, J.C., Lang, C.J.G., Lanczik, M. (1999) Demenz vom Alzheimer-Typ bei Frauen. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 67, 441-447
- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H., Gotoh, N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1322S-6S
- Oishi, M., Mochizuki, Y., Takasu, T., Chao, E., Nakamura, S. (1998) Effectiveness of Traditional Chinese Medicine in Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 12, 247-250
- Palozza, P., Krinsky, N. (1992) β -Carotene and α -Tocopherol Are Synergistic Antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 297, 184-187
- Pappert, E.J., Tangney, C.C., Goetz, C.G., Ling, Z.D., Lipton, J.W., Stebbins, G.T., Carvey, P.M. (1996) Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients: Dose-response study and correlations with plasma levels. *Neurology* 47, 1037-1042
- Paraskevas, G.P., Kapaki, E., Libitaki, G., Zournas, C., Segditsa, I., Papageorgiou, C. (1997) Ascorbate in healthy subjects, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 96, 88-90
- Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch* (1998) Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York
- Reiber, H., Ruff, M., Uhr, M. (1993) Ascorbate concentration in human cerebrospinal fluid (csf) and serum. Intrathecal accumulation and CSF flow rate. *Clinica Chimica Acta* 217, 163-173
- Rice, M. (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci.* 23, 209-216

Riede, Ursus-Nikolaus (1998) Taschenatlas der allgemeinen Pathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Rifici, V., Khachadurian, A. (1993) Dietary Supplementation with Vitamins C and E Inhibits In Vitro Oxidation of Lipoproteins. *Journal of the American College of Nutrition* 12, 631-637

Riviere S, Birlouez-Aragon I, Nourhashemi F, Vellas B (1998) Low plasma vitamin C in Alzheimer patients despite an adequate diet. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 13(11): 749-54

Roses, A. (1996) Apolipoprotein E in neurology. *Current Opinion in Neurology* 9, 265-270

Rottkamp, C., Nunomura, A., Hirai, K., Sayre, L., Perry, G., Smith, M. (2000) Will antioxidants fulfill their expectations for the treatment of Alzheimer disease? *Mechanisms of Aging and Development* 116, 169-179

Rottkamp, C., Nunomura, A., Raina, A., Sayre, L., Perry, G., Smith, M. (2000) Oxidative Stress, Antioxidants, and Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 14, S62-S66

Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R., Klauber, M., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C., Pfeiffer, E., Schneider, L., Thal, L. (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* 336, 1216-1222

Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Stürenberg, H.-J., Mann, U., Müller-Thomsen, T., Beisiegel, U. (2000) Increased Lipoprotein Oxidation in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 351-360

Sies, H., Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1315S-21S

Sinclair AJ, Bayer AJ, Johnston J, Warner C, Maxwell SR (1998) Altered plasma antioxidant status in subjects with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 13(12): 840-5

Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R. (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10540-10543

Smith, M., Rottkamp, C., Nunomura, A., Raina, A., Perry, G. (2000) Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1502, 139-144

Subbarao, K., Richardson, J., Ang, L. (1990) Autopsy samples of Alzheimer's Cortex Show Increased Peroxidation in Vitro. *Journal of Neurochemistry* 55, 342-345

Sugawa, M., Ikeda, S., Kushima, Y., Takashima, Y., Cynshi, O. (1997) Oxidized low density lipoprotein caused CNS neuron cell death. *Brain research* 761, 165-172

Tamaoka, A., Miyatake, F., Matsuno, S., Ishii, K., Nagasa, S., Sahara, N., Ono, S., Mori, H., Wakabayashi, K., Tsyji, S., Takahashi, H., Shoji, S. (2000) Apolipoprotein E allele-dependent antioxidant activity in brains with Alzheimer's disease. *Neurology* 54, 2319-2321

Thomas, S., Neuzil, J., Mohr, D., Stocker, R. (1995) Coantioxidants make α -Tocopherol and efficient antioxidant for low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1357S-64S

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

Traber, M., Arai, H. (1999) Molecular Mechanisms of Vitamin E Transport. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 343-355

Traber, M., Sies, H. (1996) Vitamin E in humans: Demand and Delivery. *Annu. Rev. Nutr.* 16, 321-47

Vatassery, G., Fahn, S., Kuskowski, M., The Parkinson Study Group (1998) Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. *Neurology* 50, 1900-1902

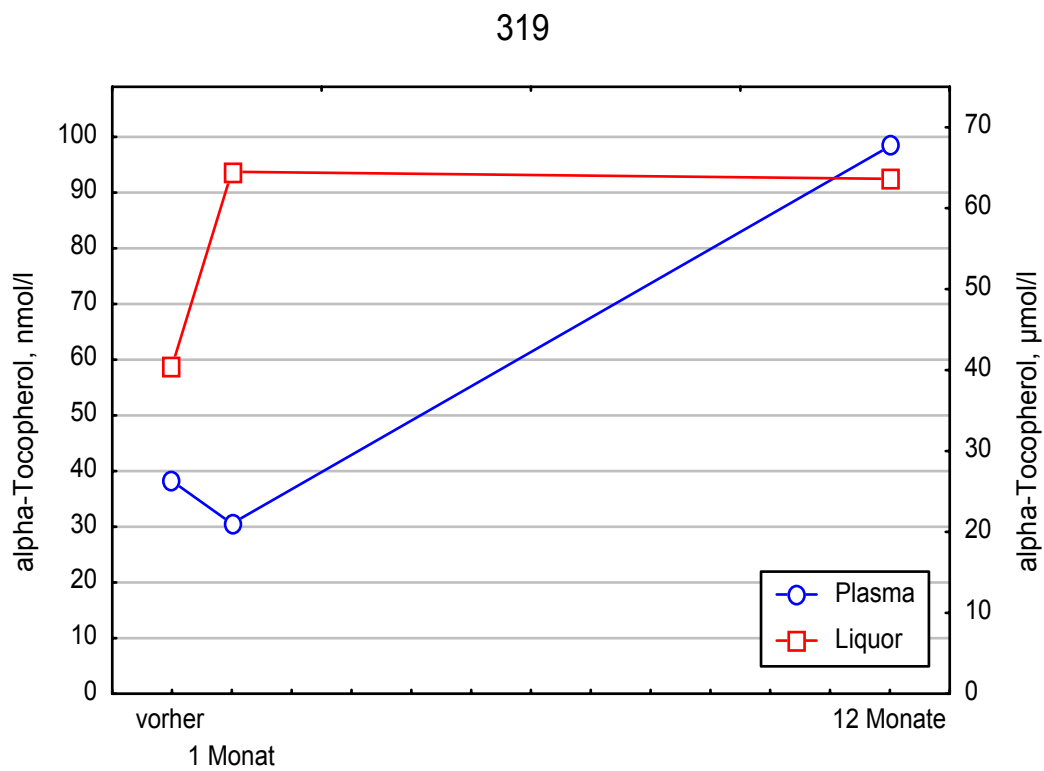
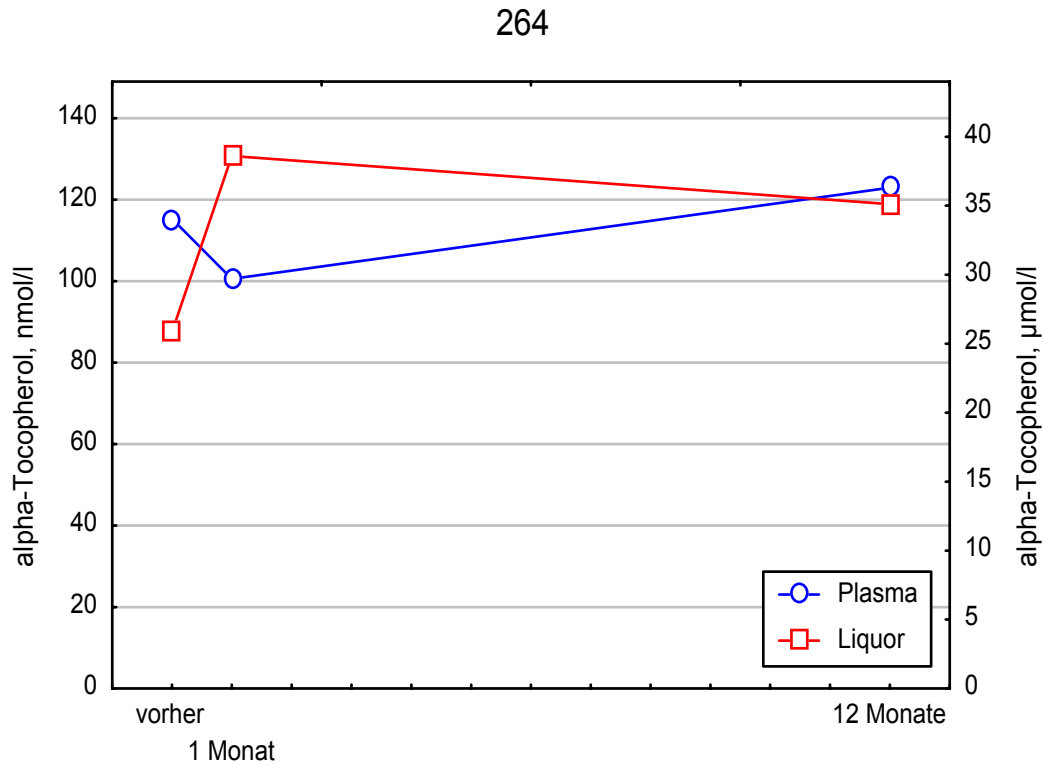
Vatassery, GT., Nelson, MJ., Maletta, GJ., Kuskowski, MA. (1991) Vitamin E (tocopherols) in human cerebrospinal fluid. *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 95-9

Vyth, A., Timmer, J., Bossuyt, P., Louwerse, E., Vianney de Jong, J.M.B. (1996) Survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis, treated with an array of antioxidants. *Journal of the Neurological Sciences* 139, 99-103

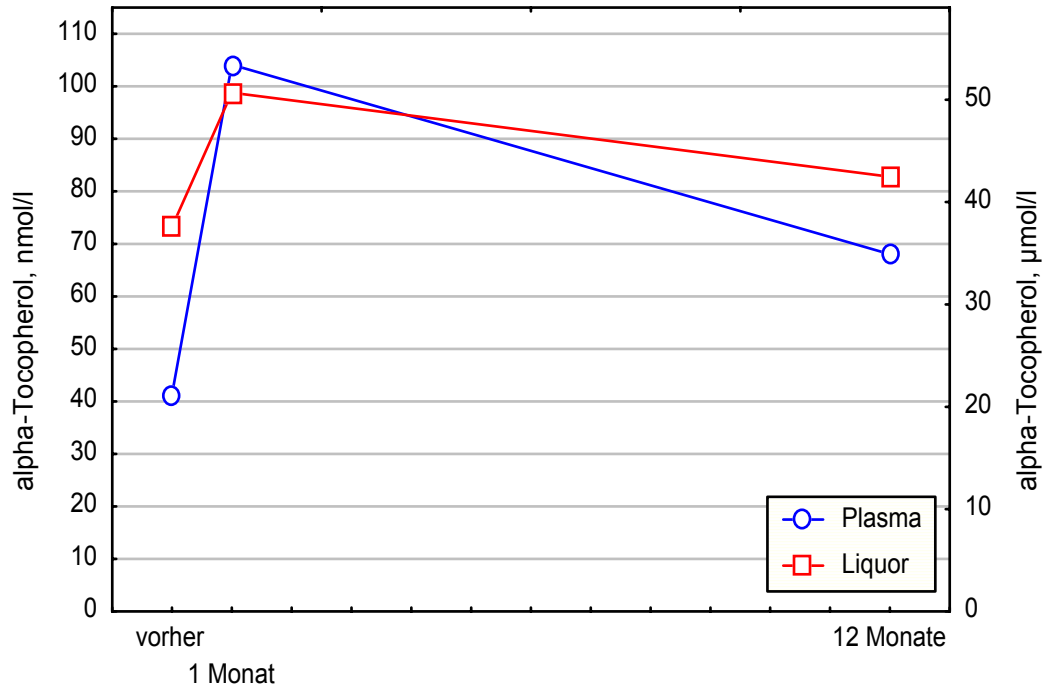
Ziouzenkova, O., Winklhofer-Roob, B., Puhl, H., Roob, J., Esterbauer, H. (1996) Lack of correlation between the α -tocopherol content of plasma and LDL, but high correlations for γ -tocopherol and carotenoids. *Journal of Lipid research* 37, 1936-1946

8 Anhang

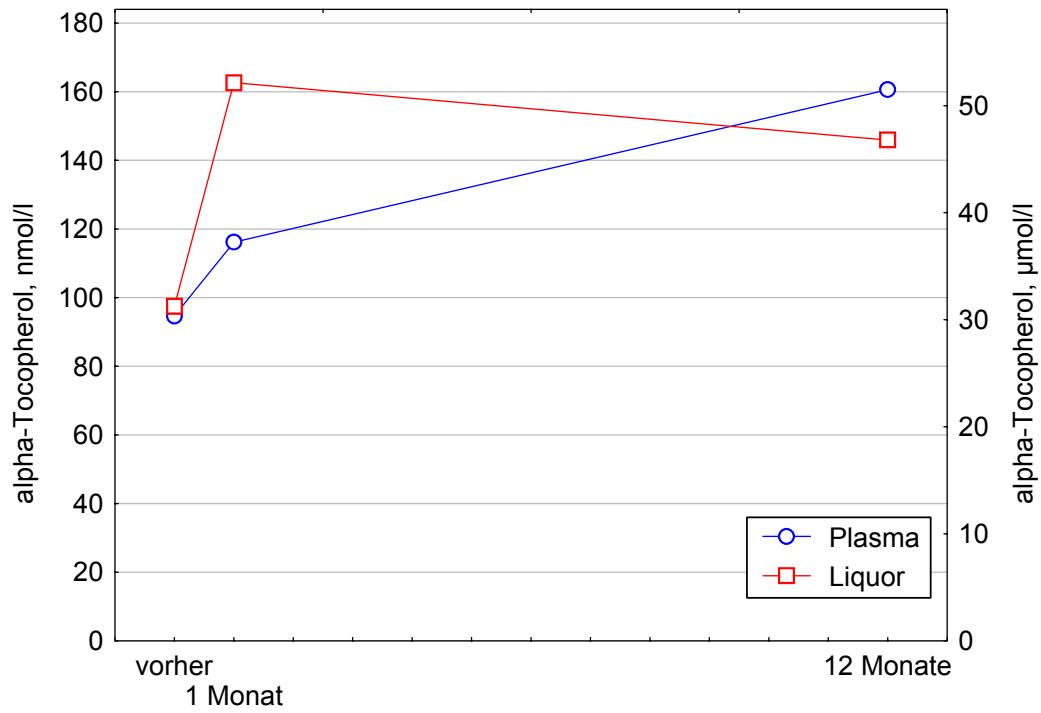
Abbildung 1: Vitamin E im Plasma und im Liquor, Einzeldarstellungen



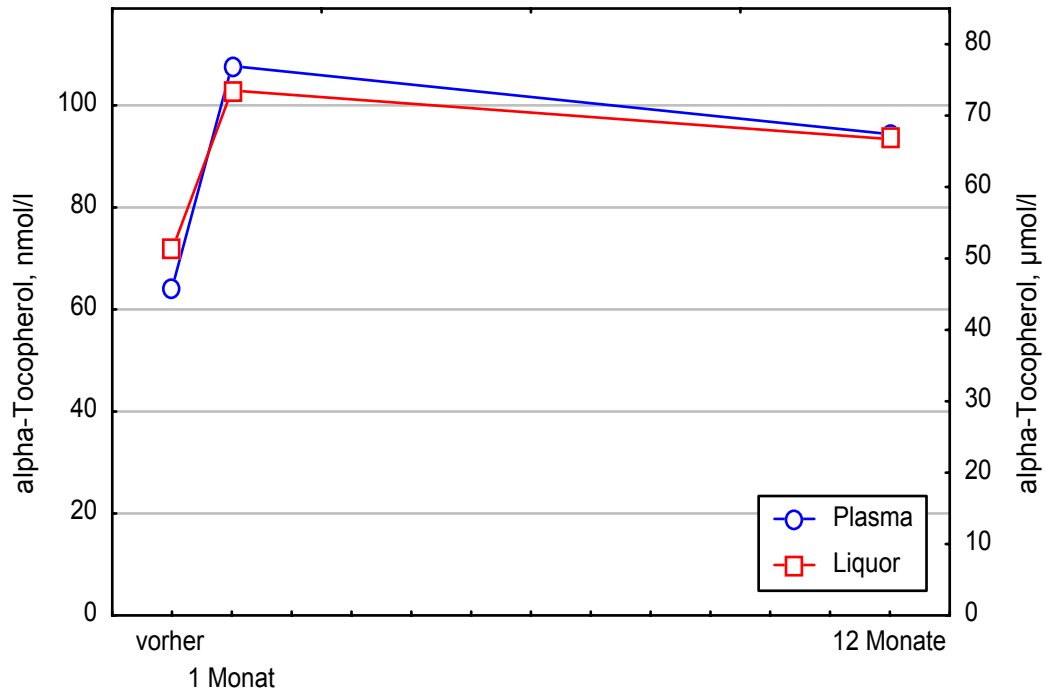
054



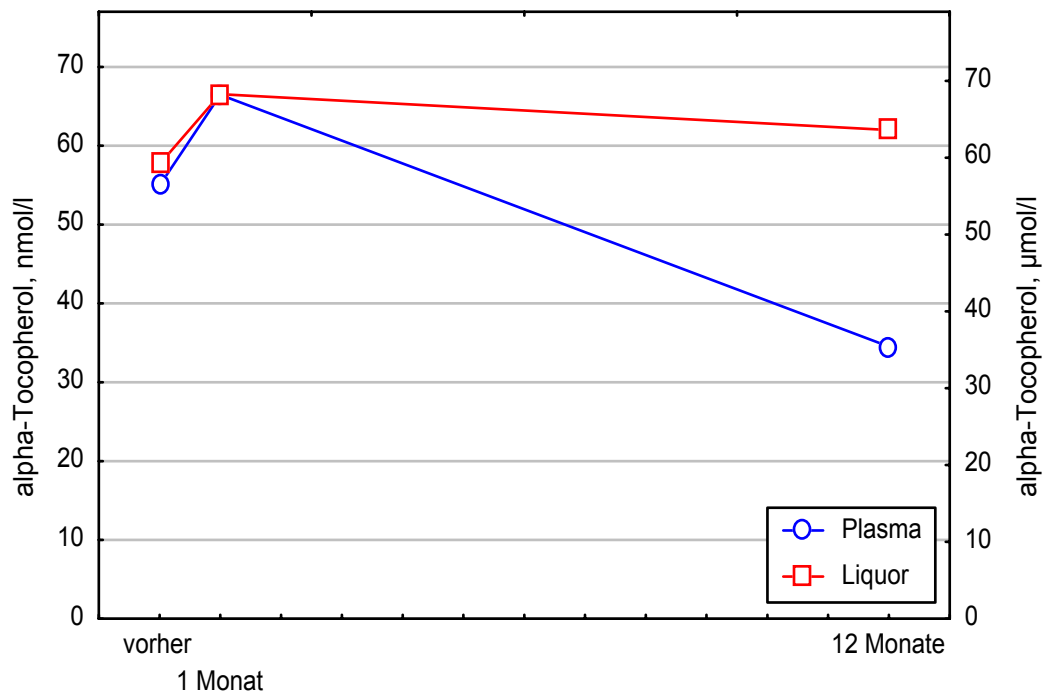
309



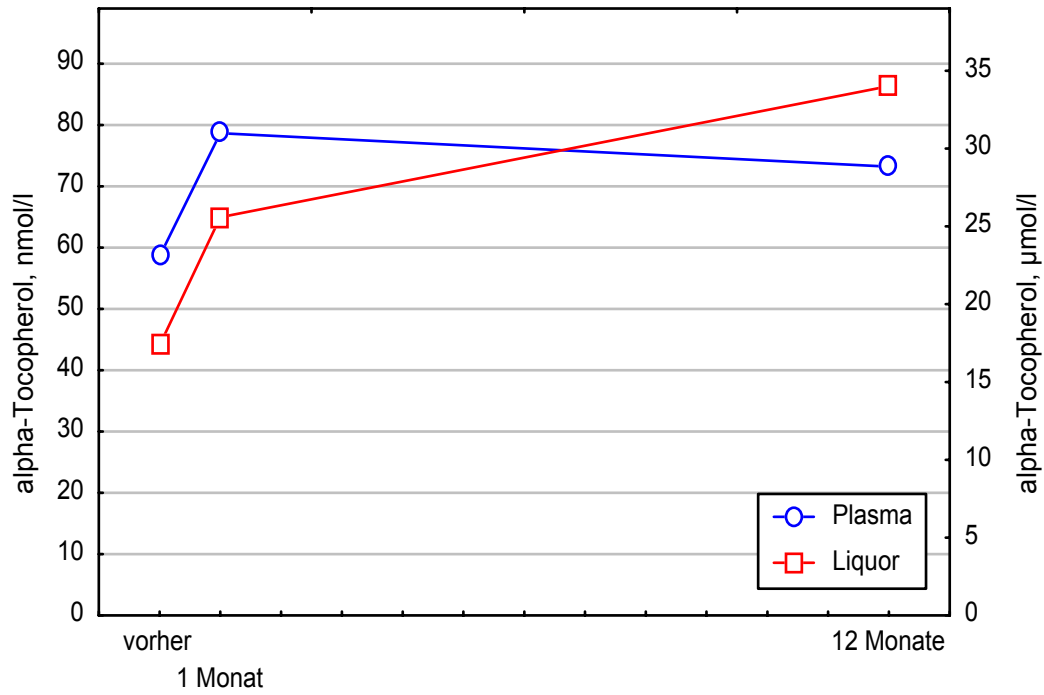
339



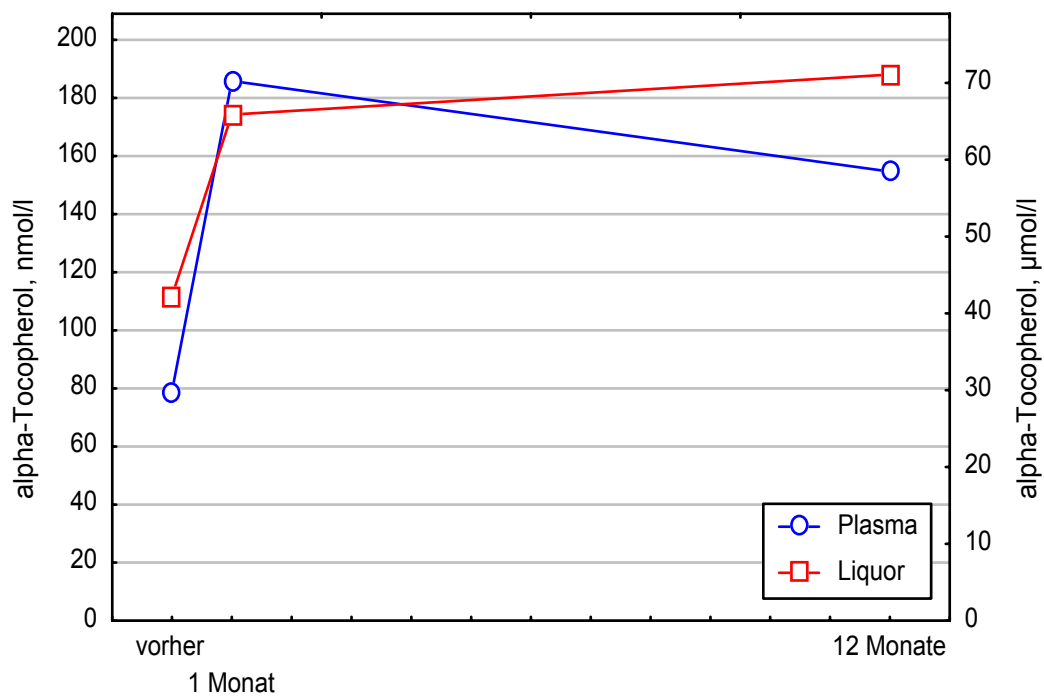
352



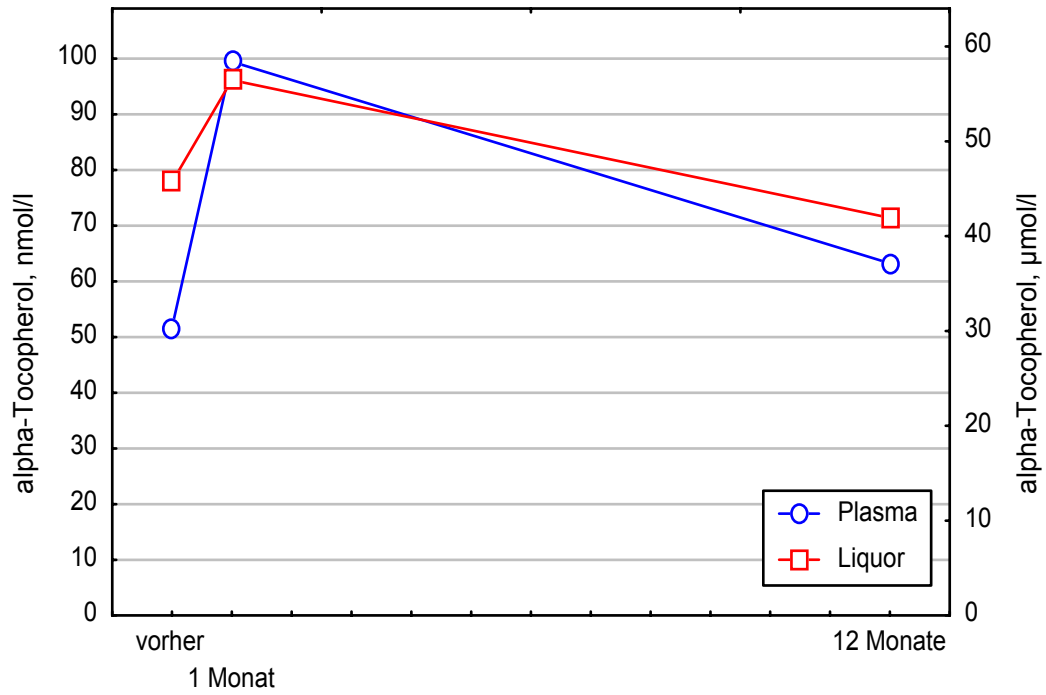
354



360



361



374

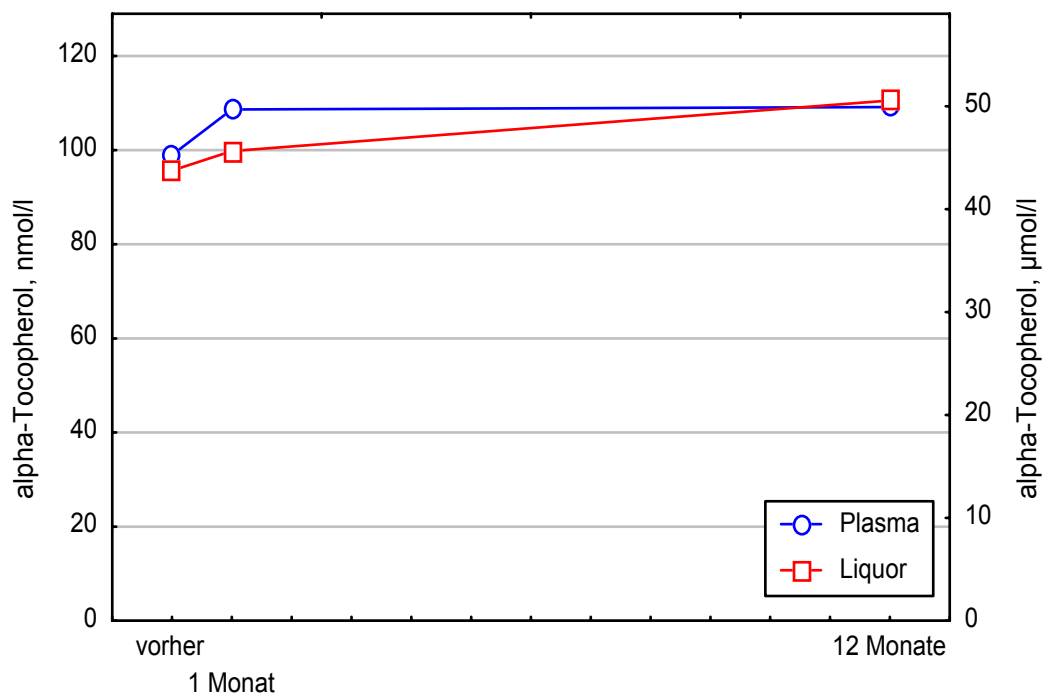
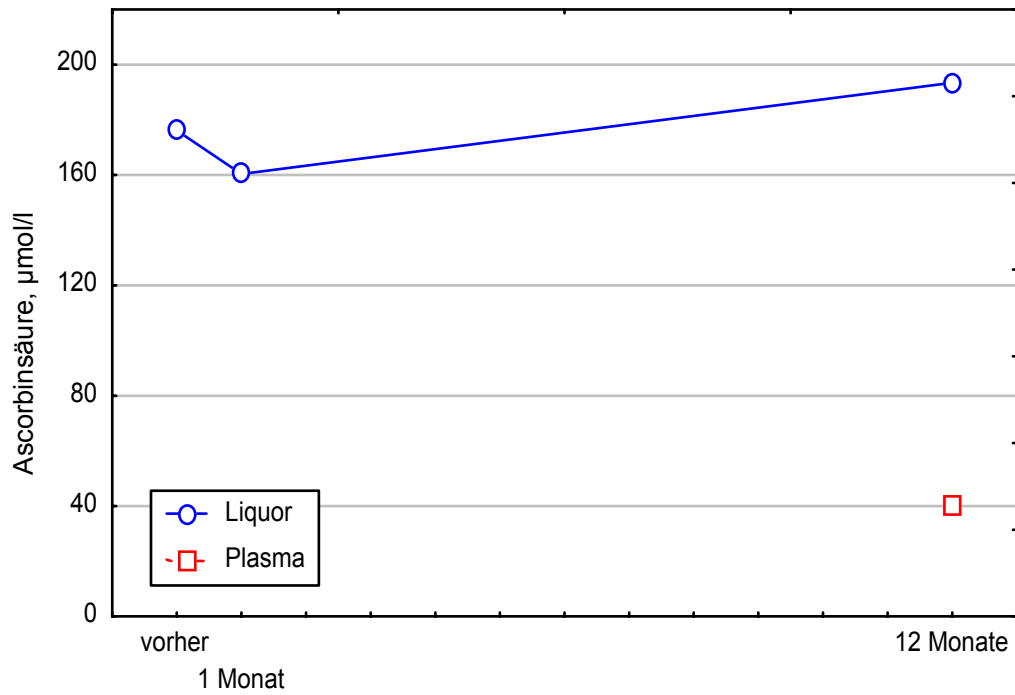
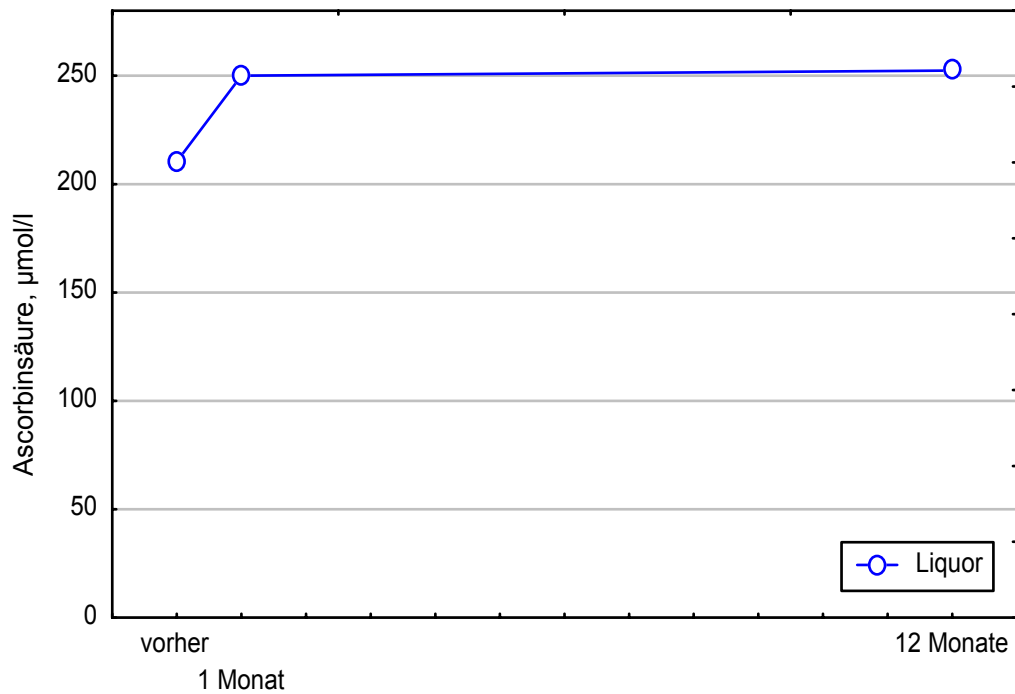


Abbildung 2: Vitamin C im Plasma und im Liquor, Einzeldarstellungen

264

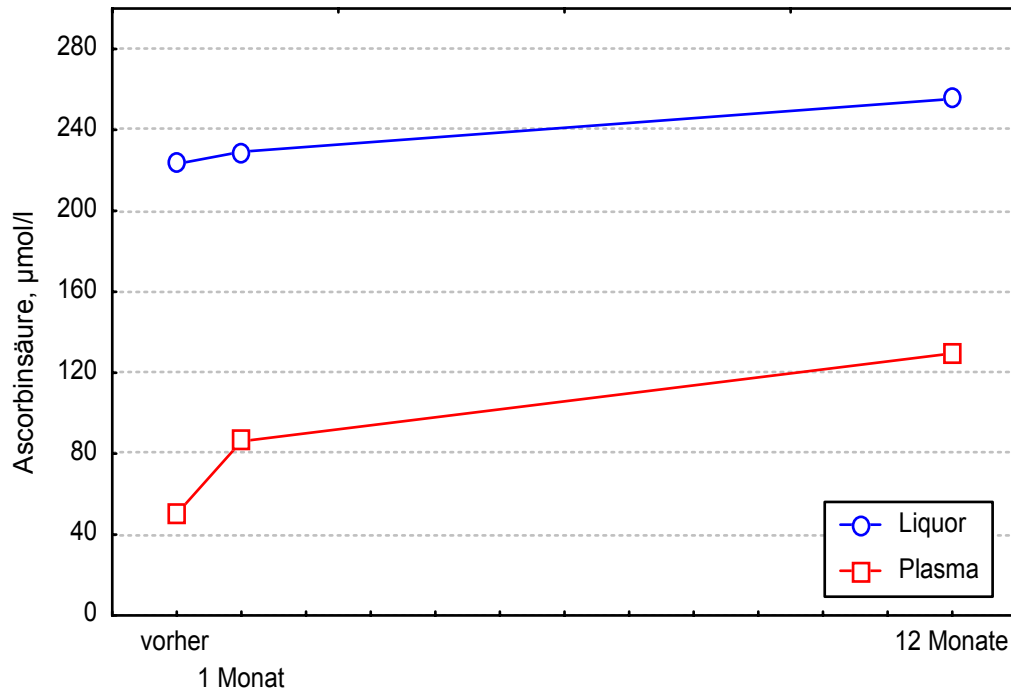


319

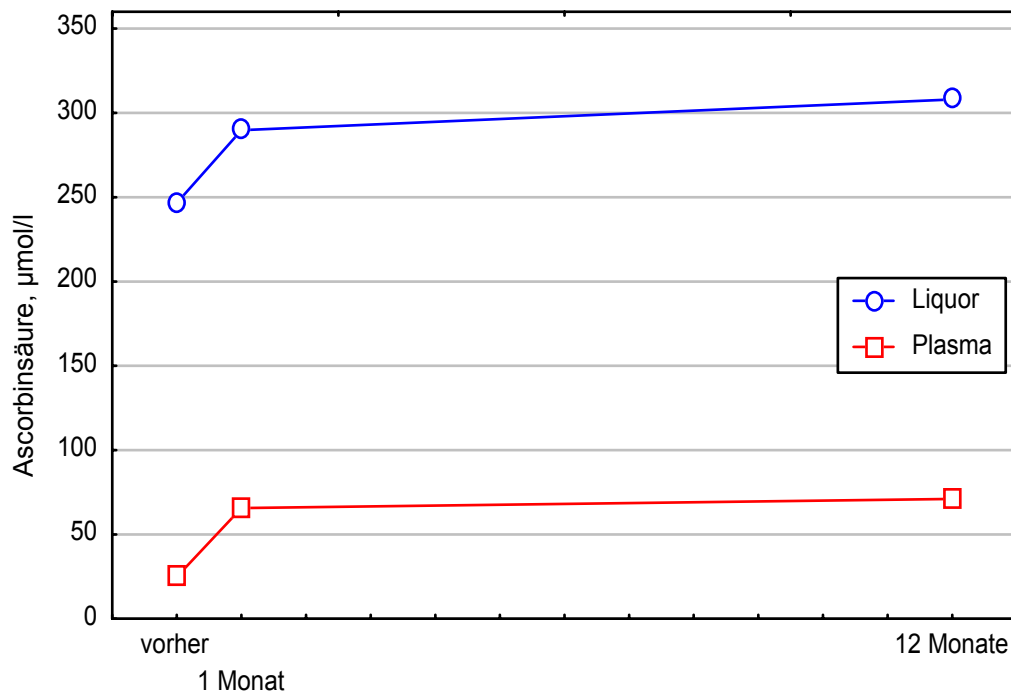


107

054

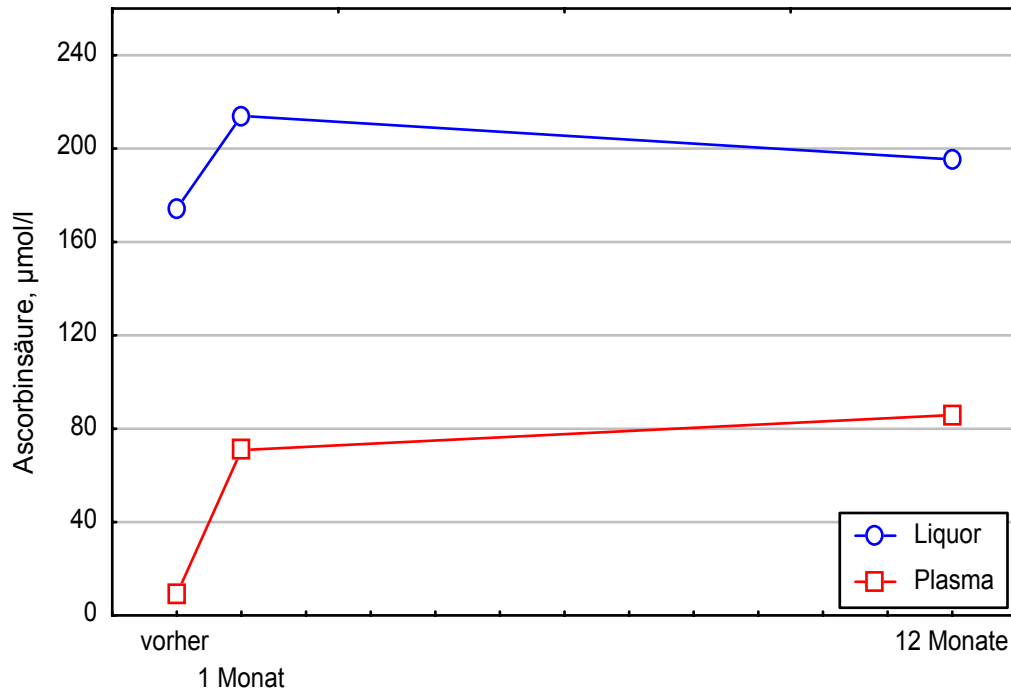


309

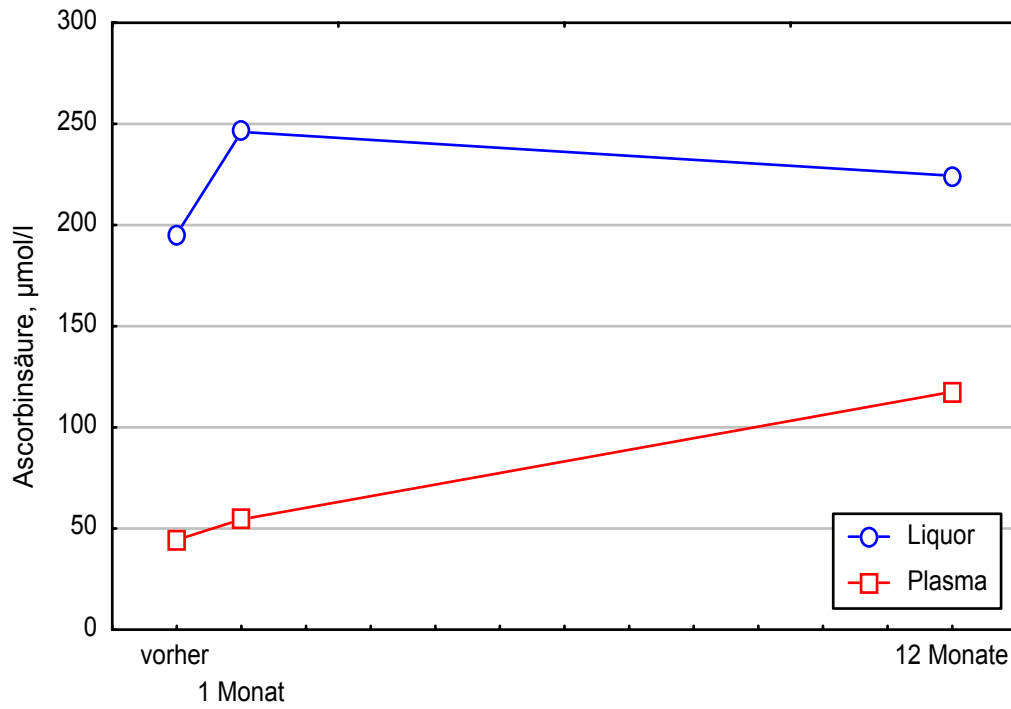


108

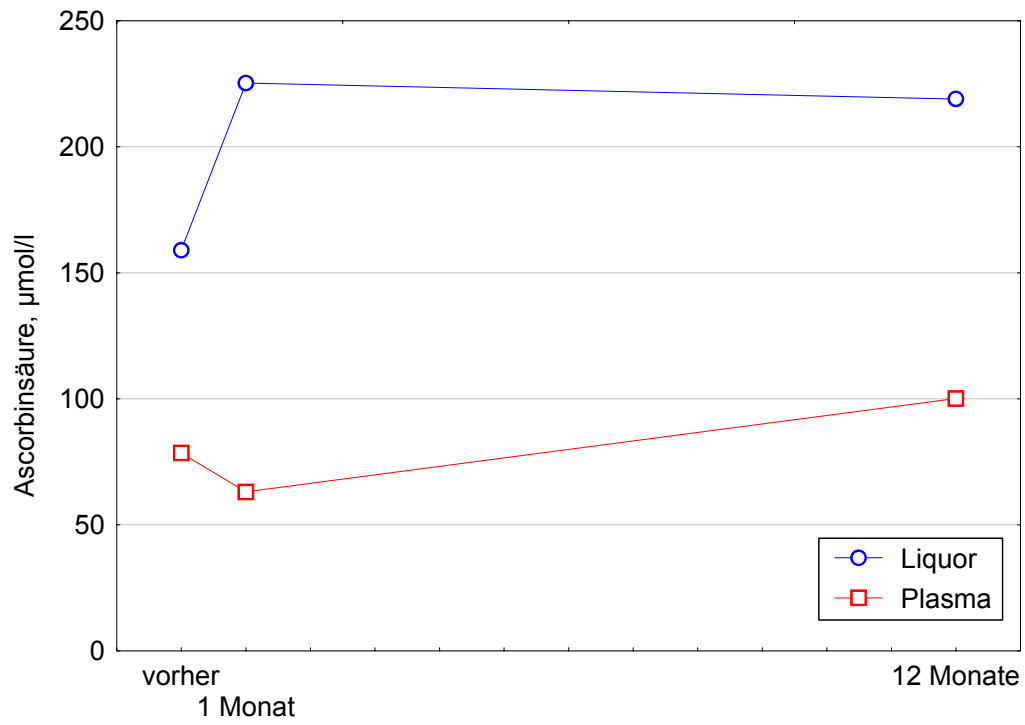
339



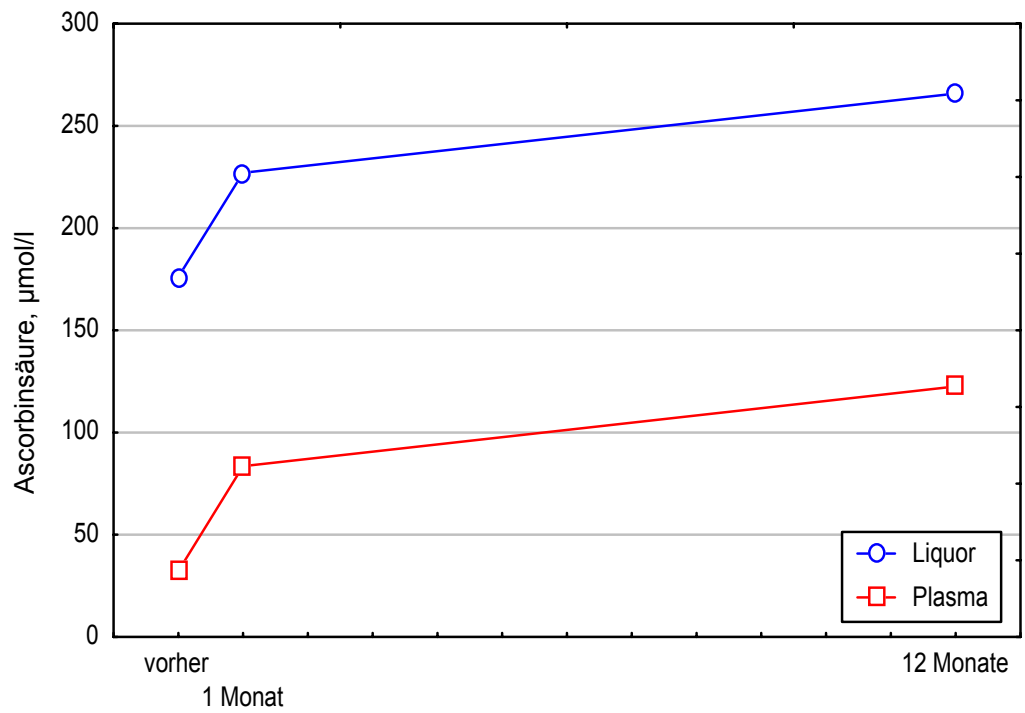
352



354

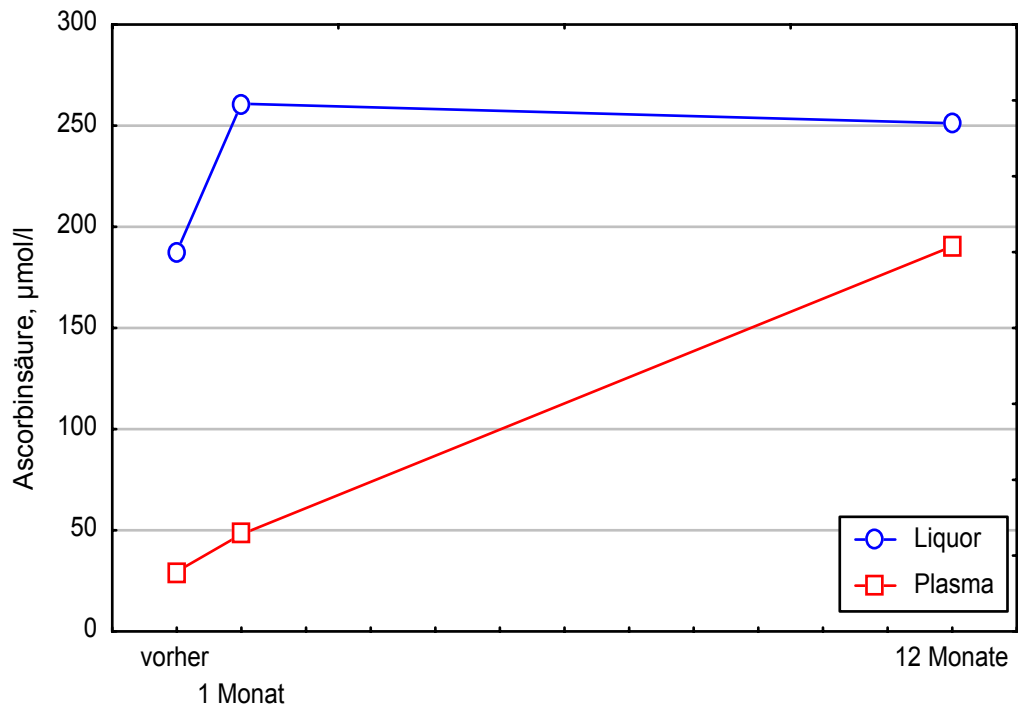


360



110

361



374

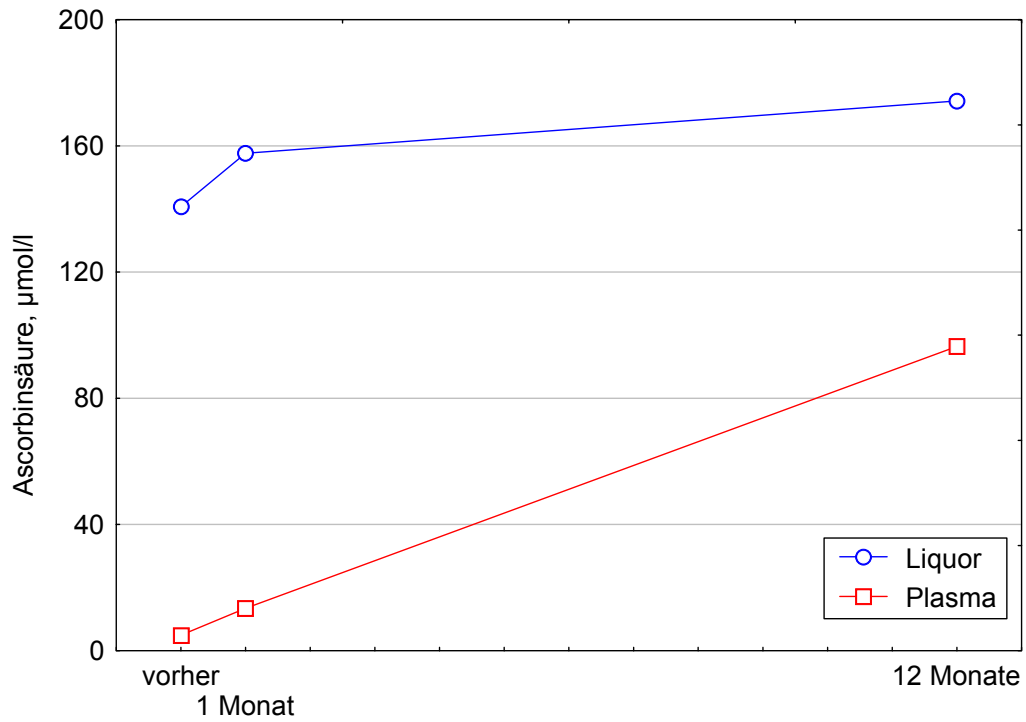
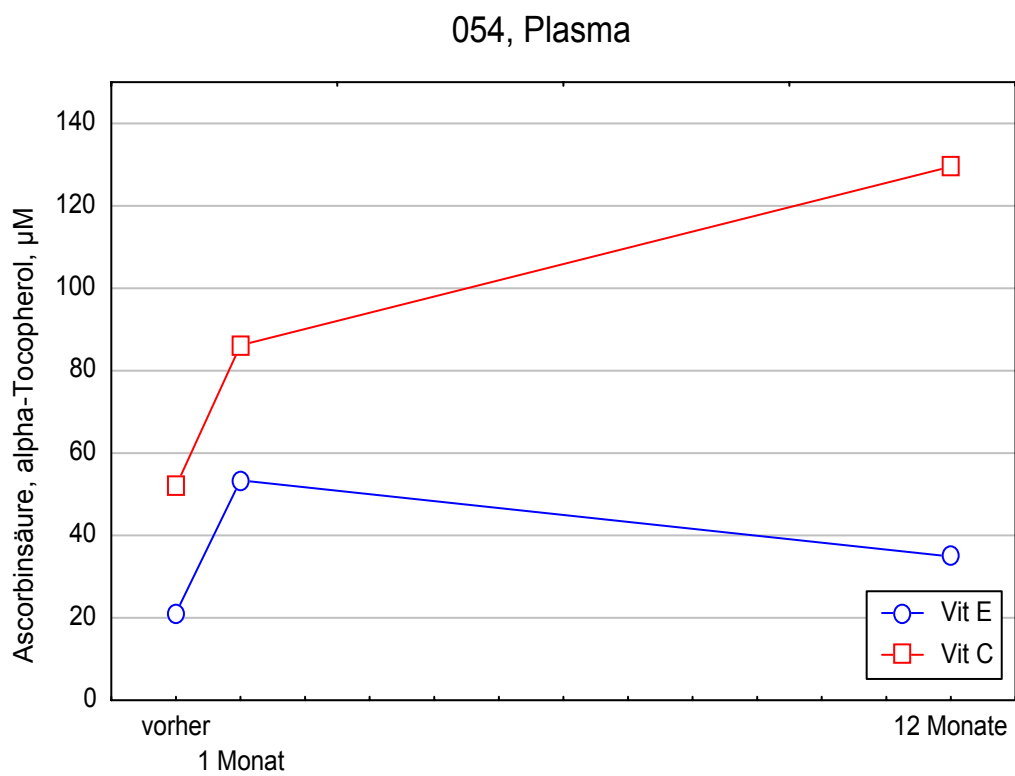
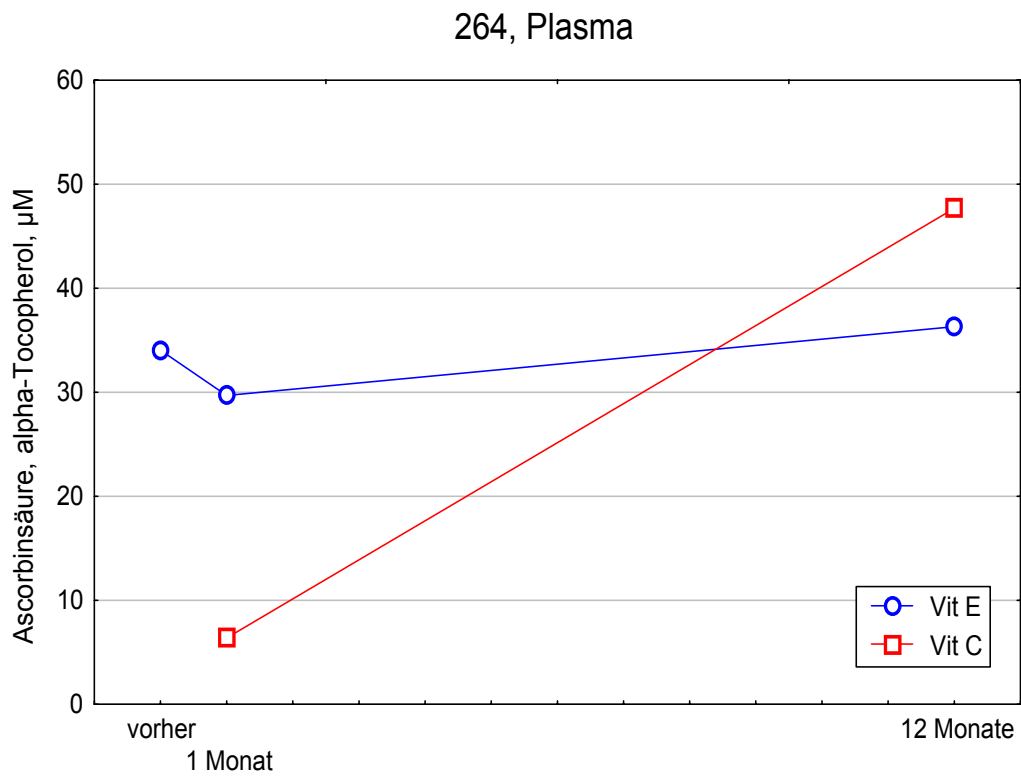
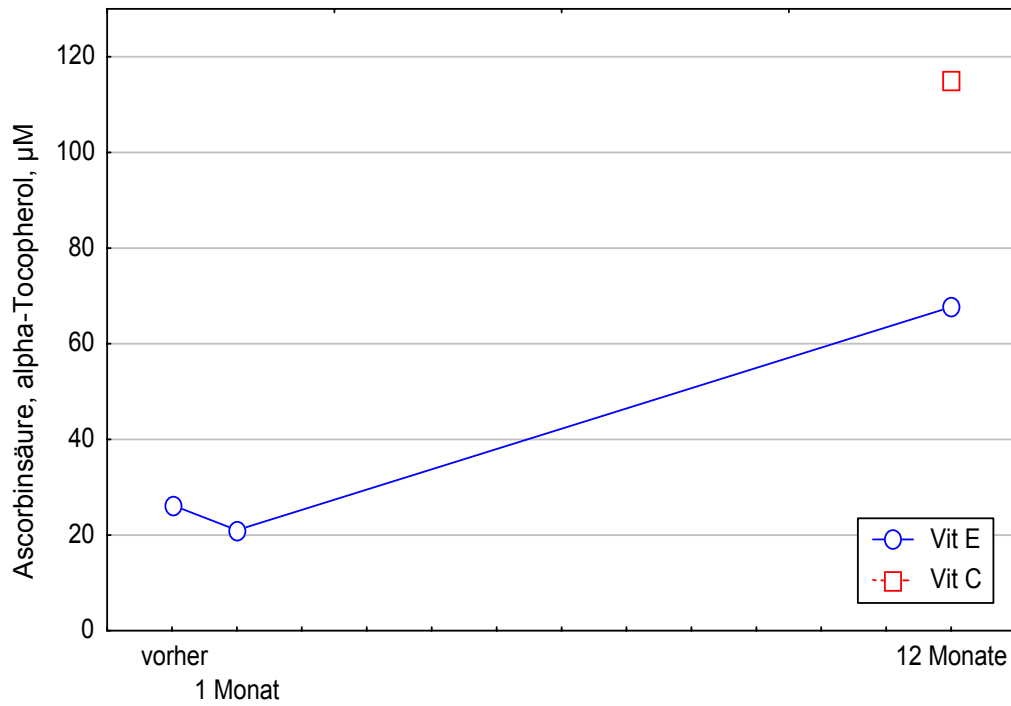


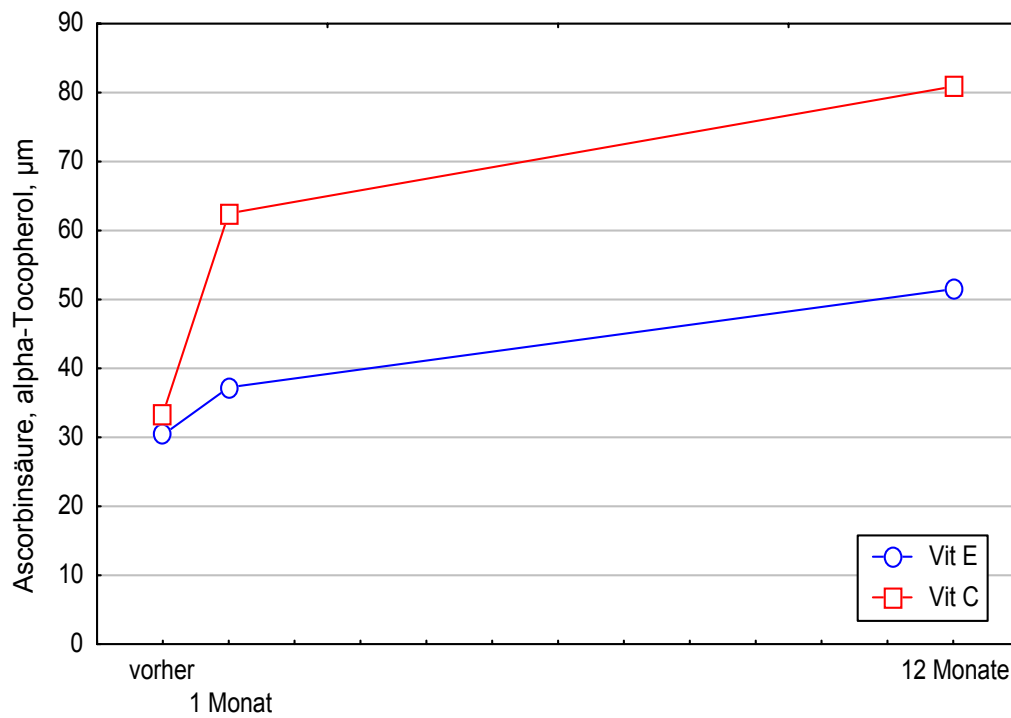
Abbildung 3: Vitamin E und Vitamin C im Plasma, Einzeldarstellungen



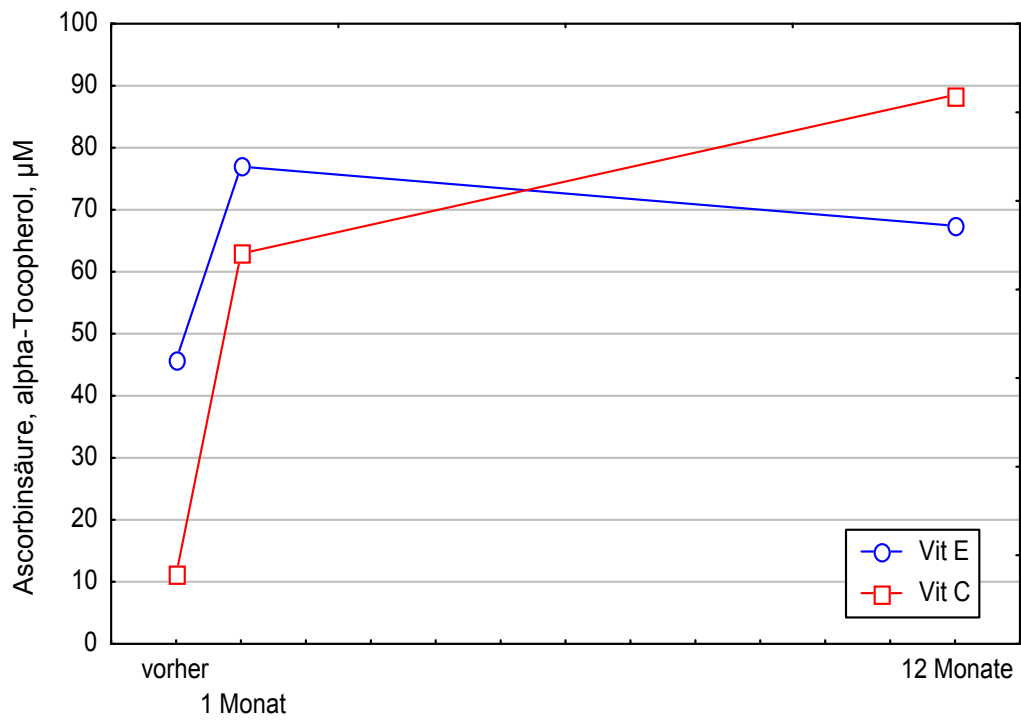
319, Plasma



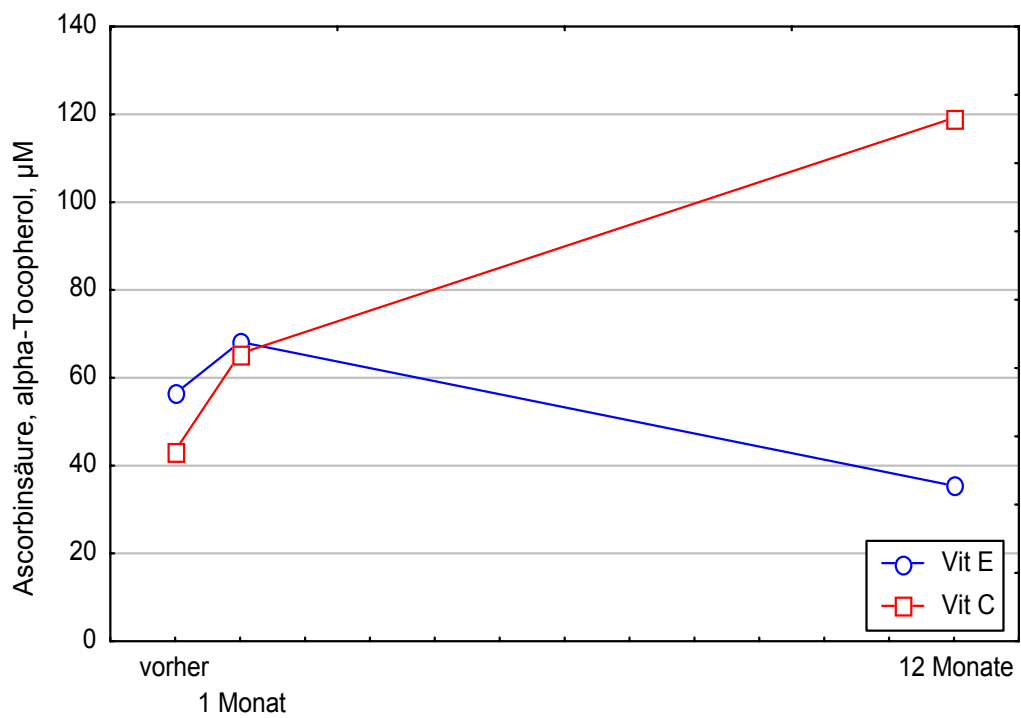
309, Plasma



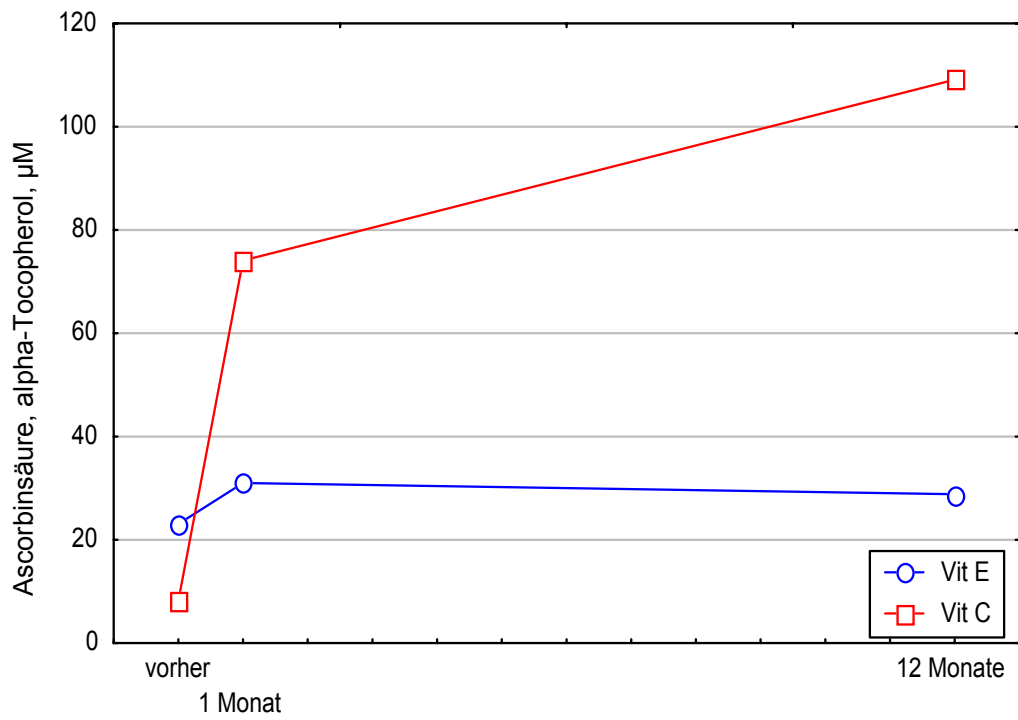
339, Plasma



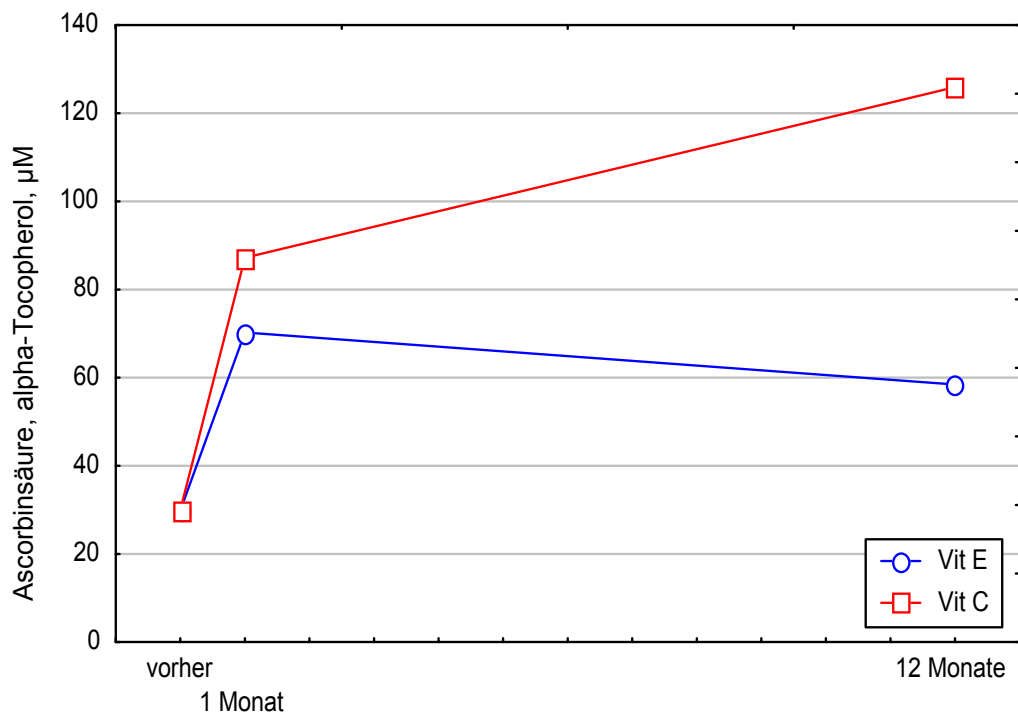
352, Plasma



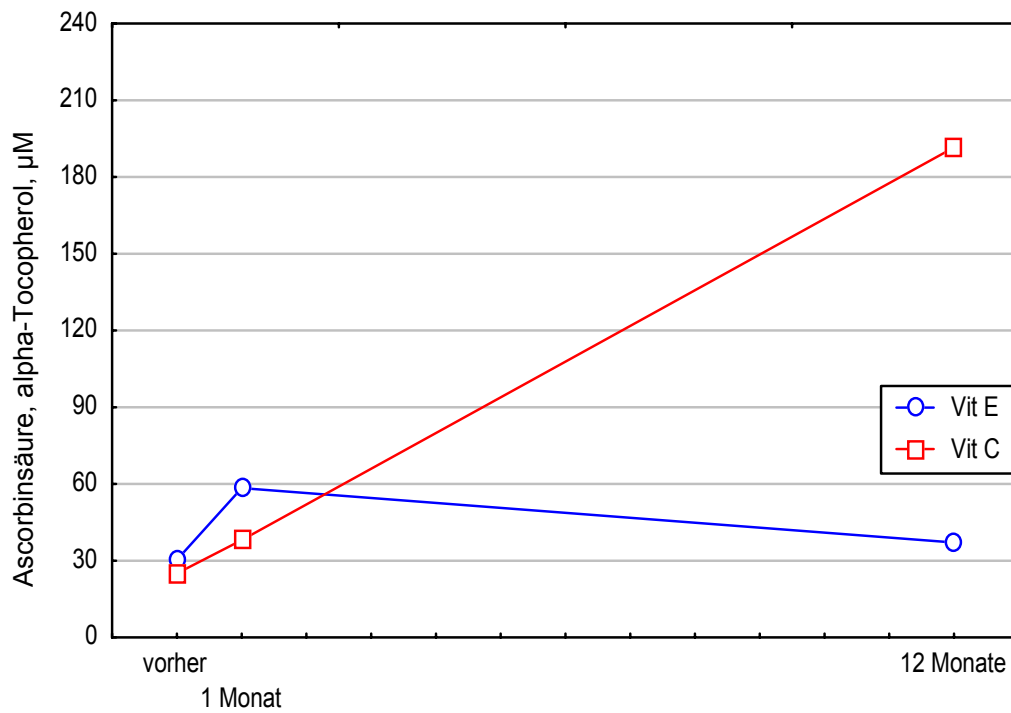
354, Plasma



360, Plasma



361, Plasma



374, Plasma

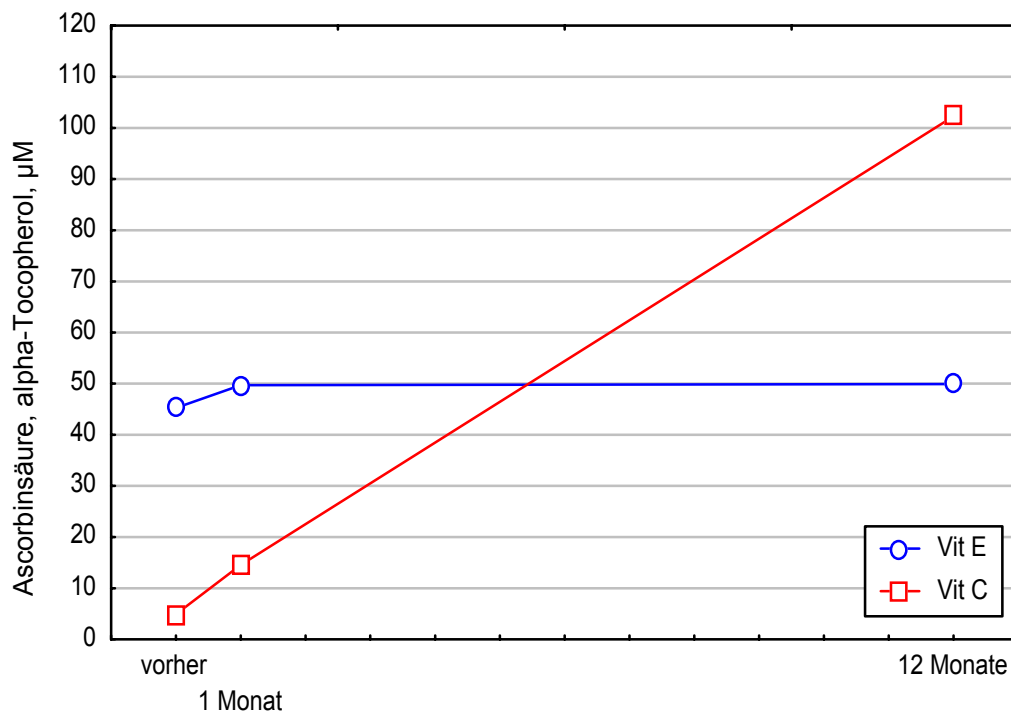
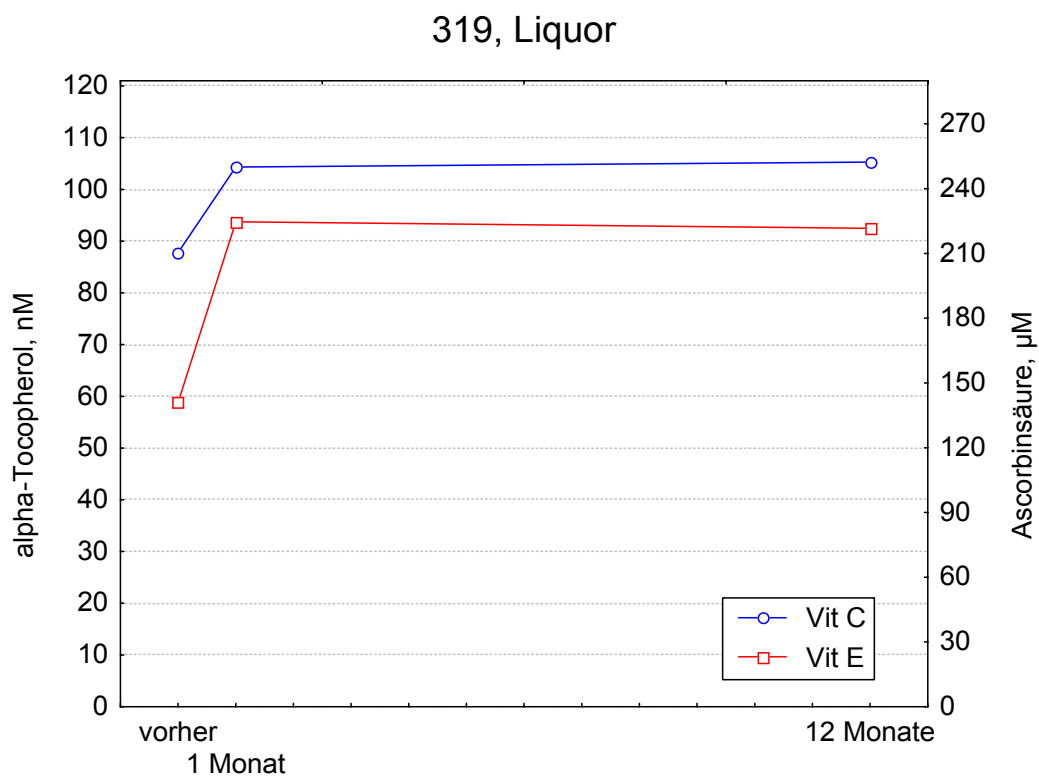
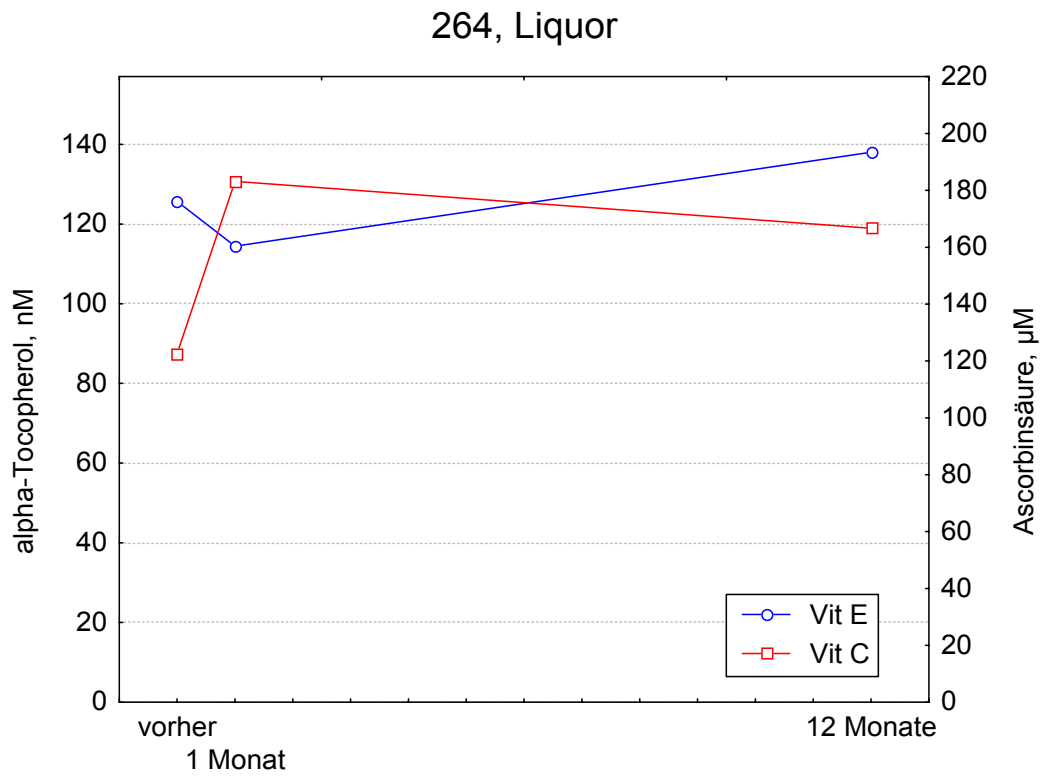
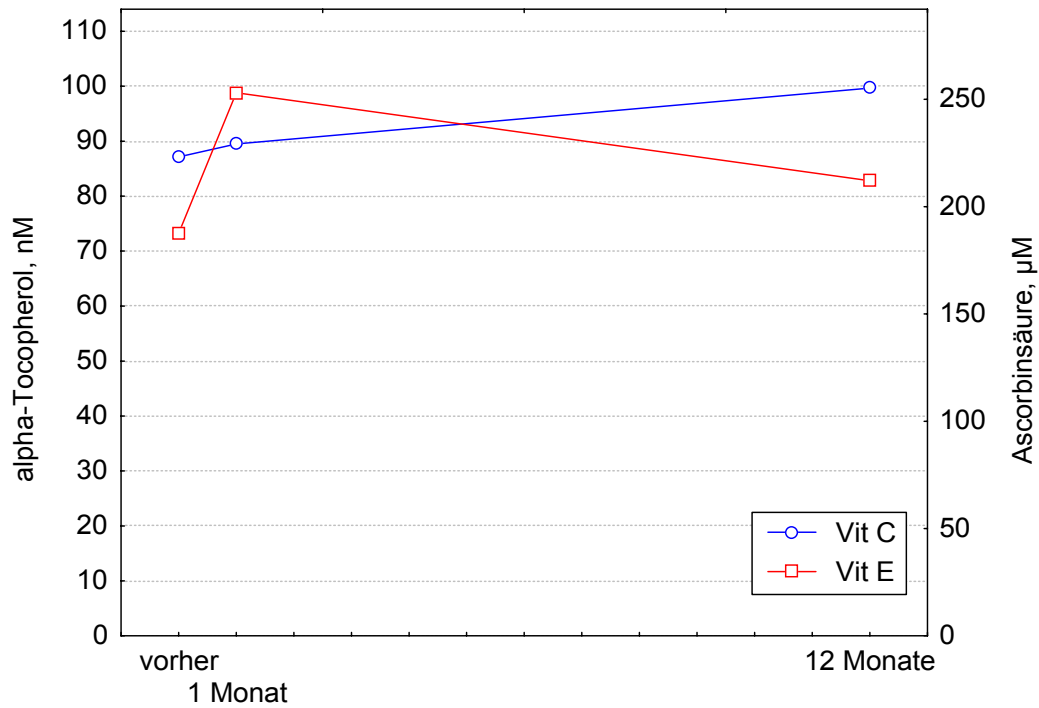


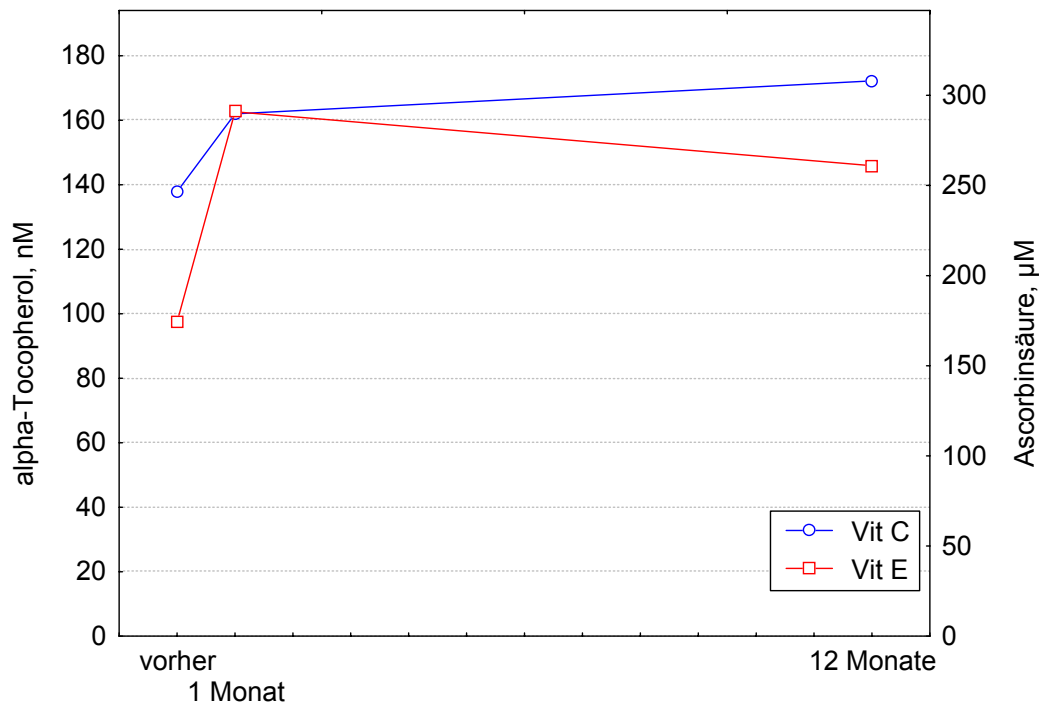
Abbildung 4: Vitamin E und Vitamin C im Liquor



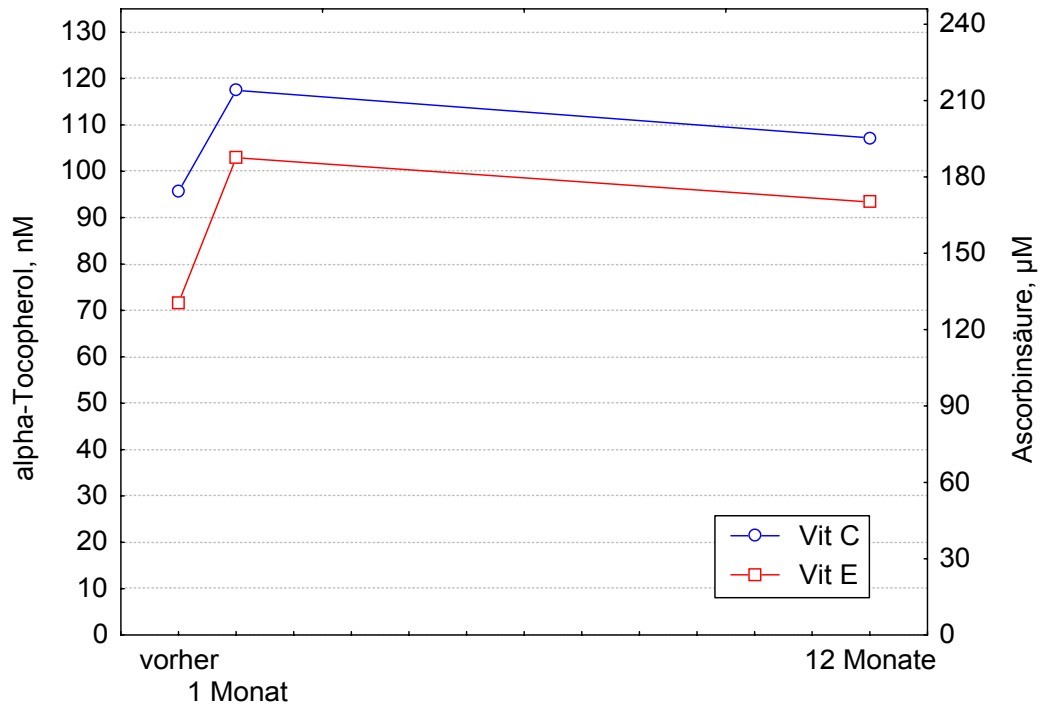
054, Liquor



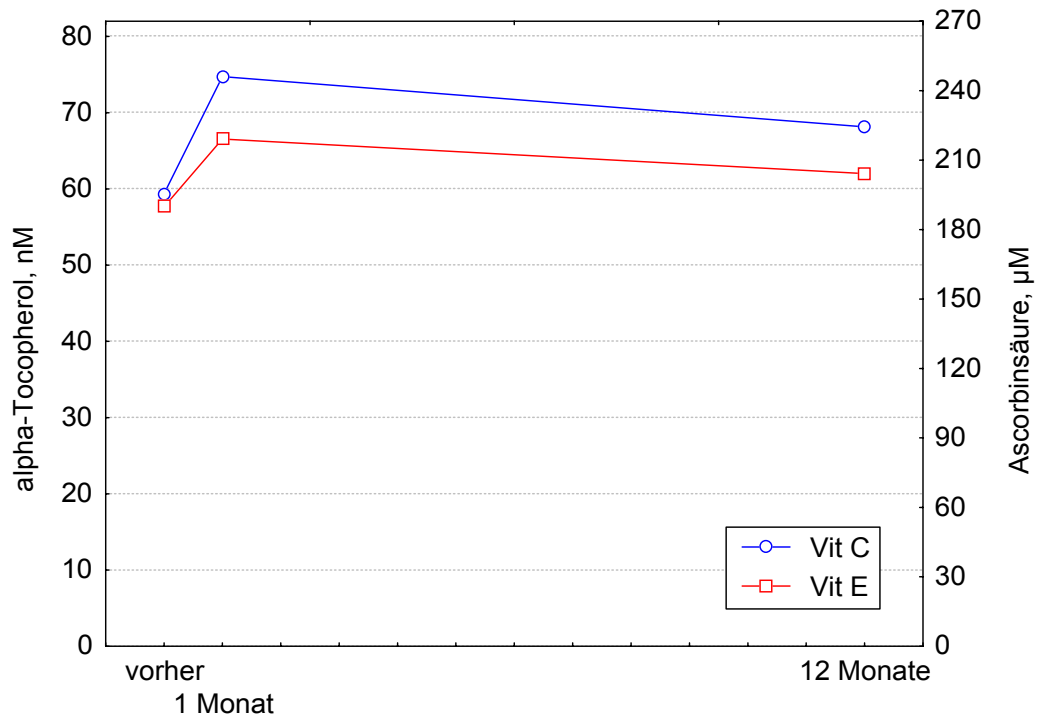
309, Liquor



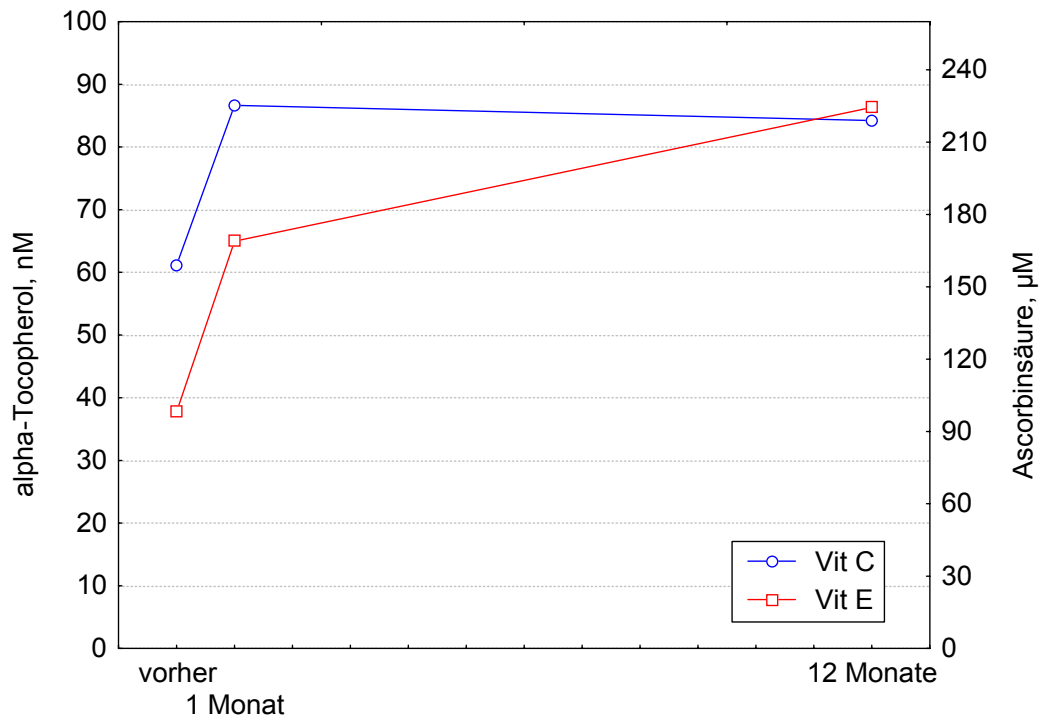
339, Liquor



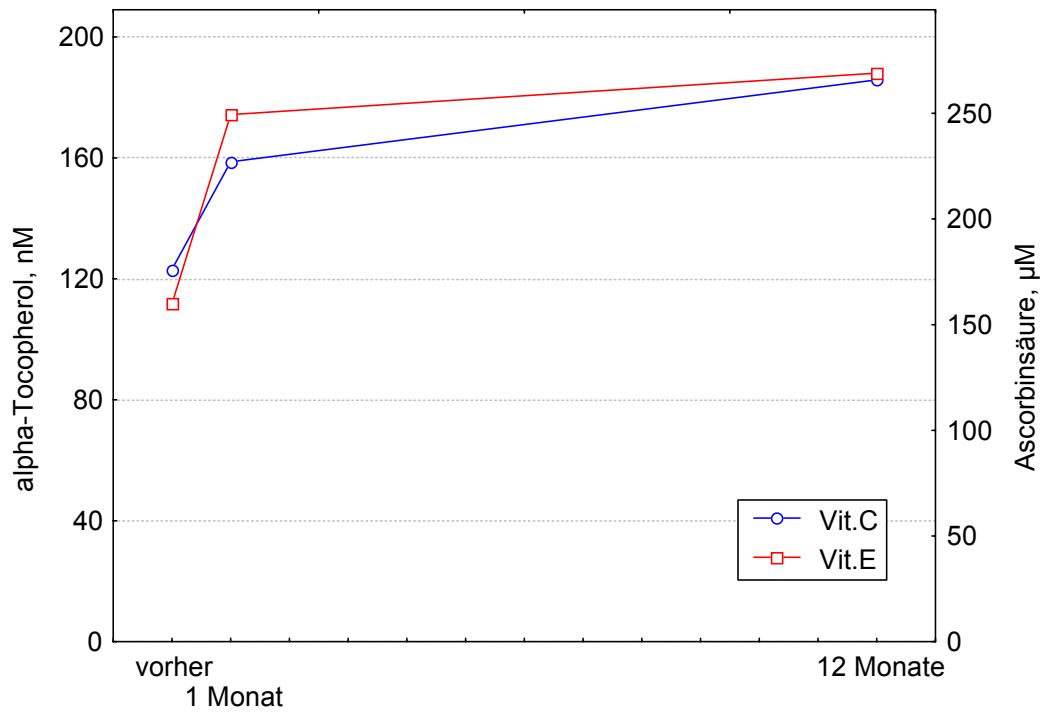
352, Liquor



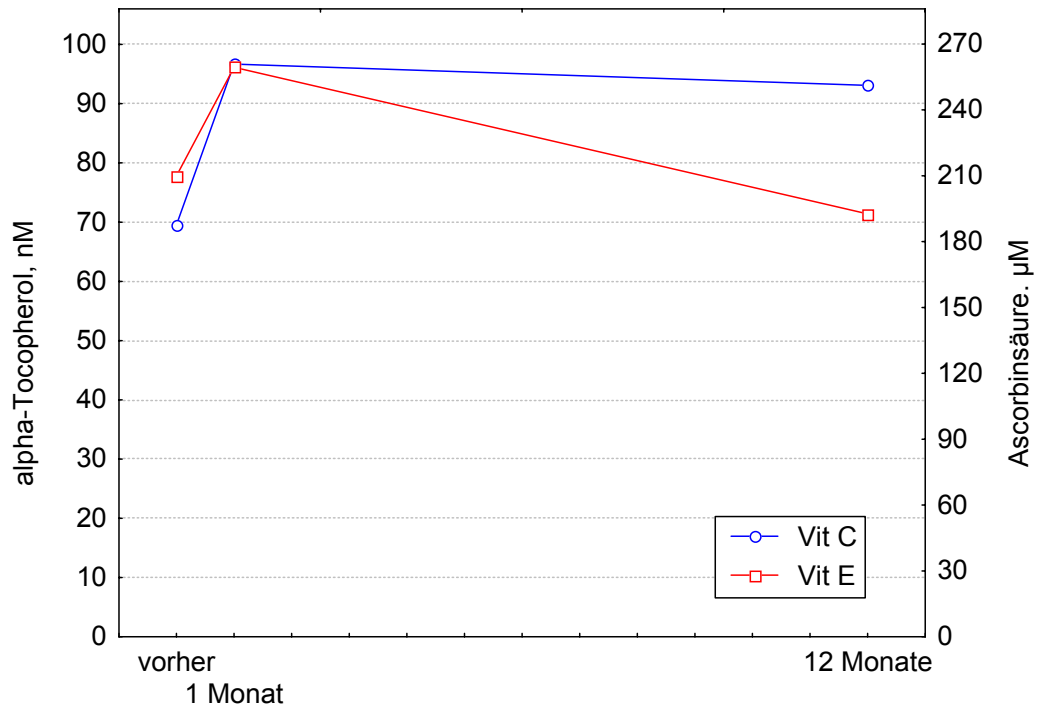
354, Liquor



360



361, Liquor



374, Liquor

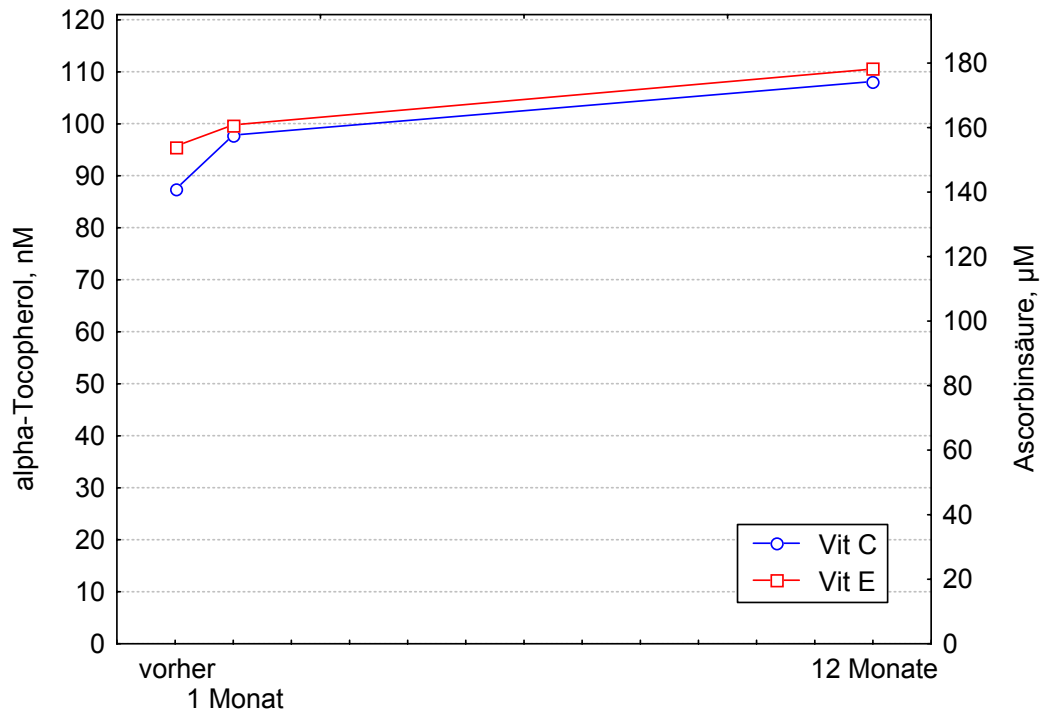
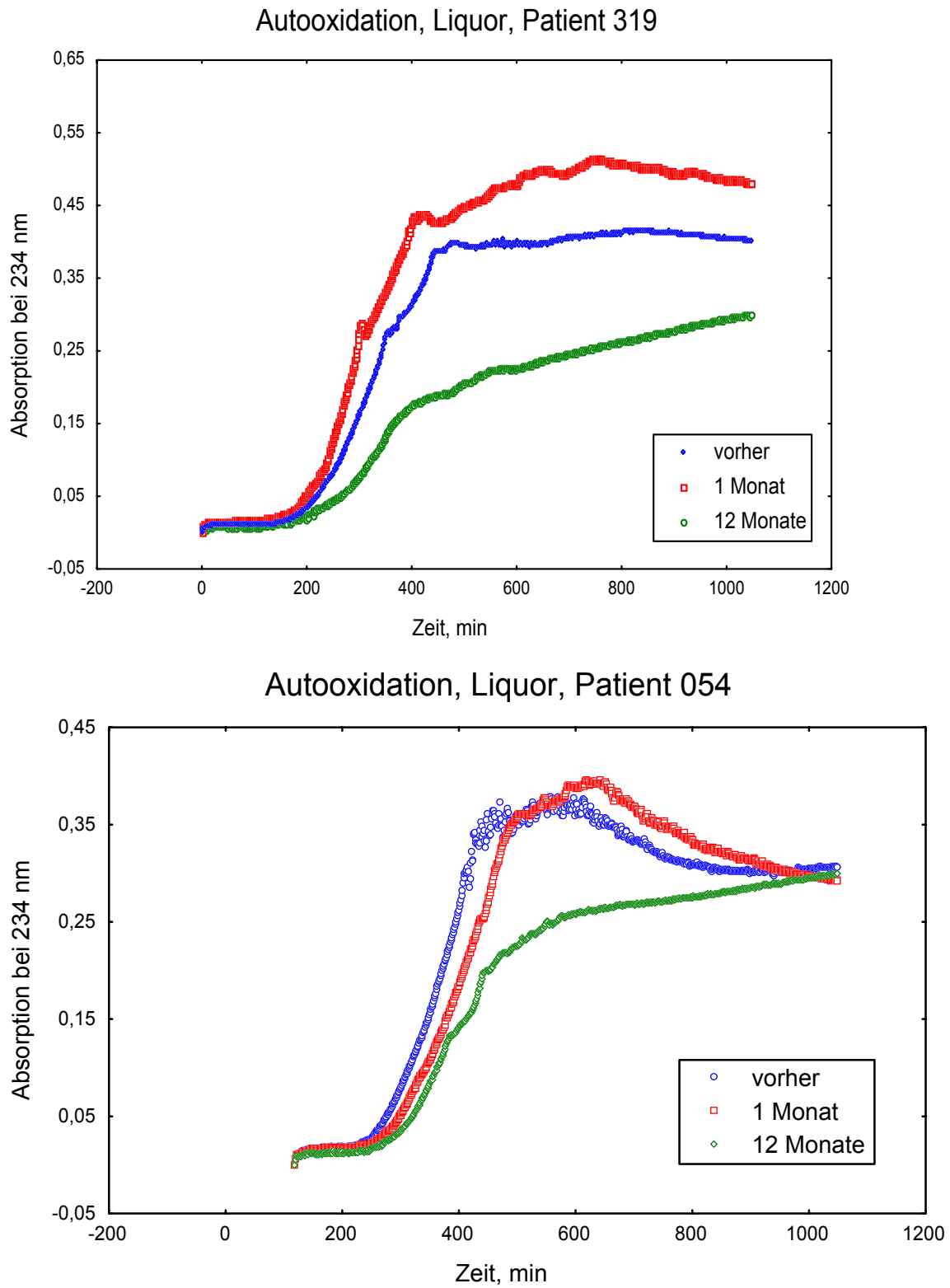
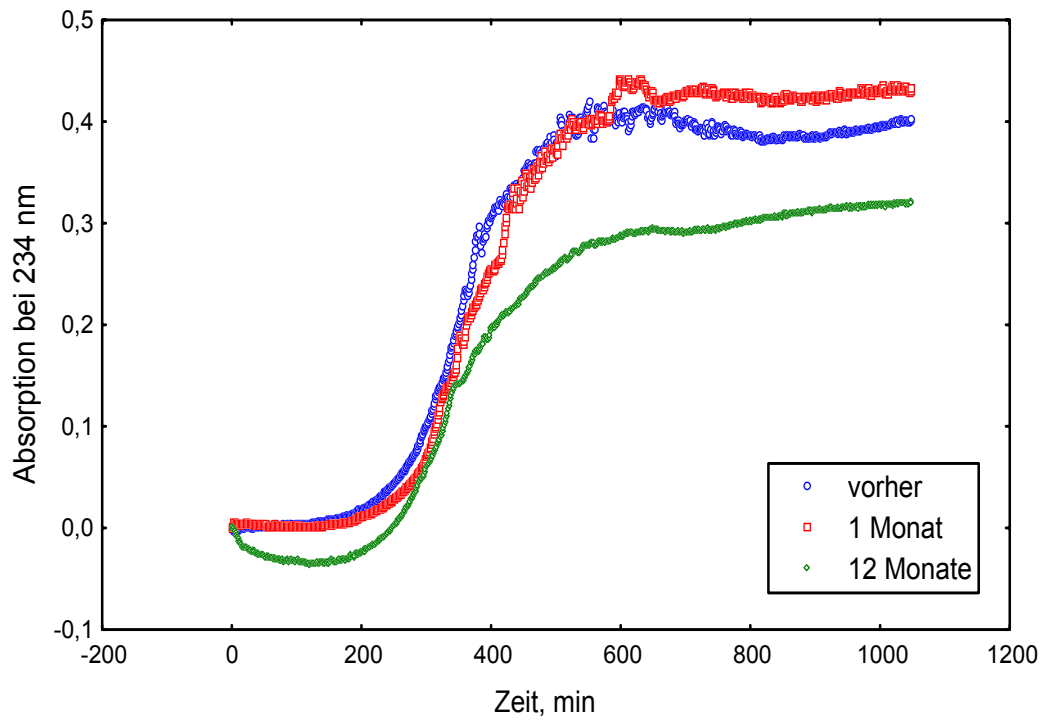


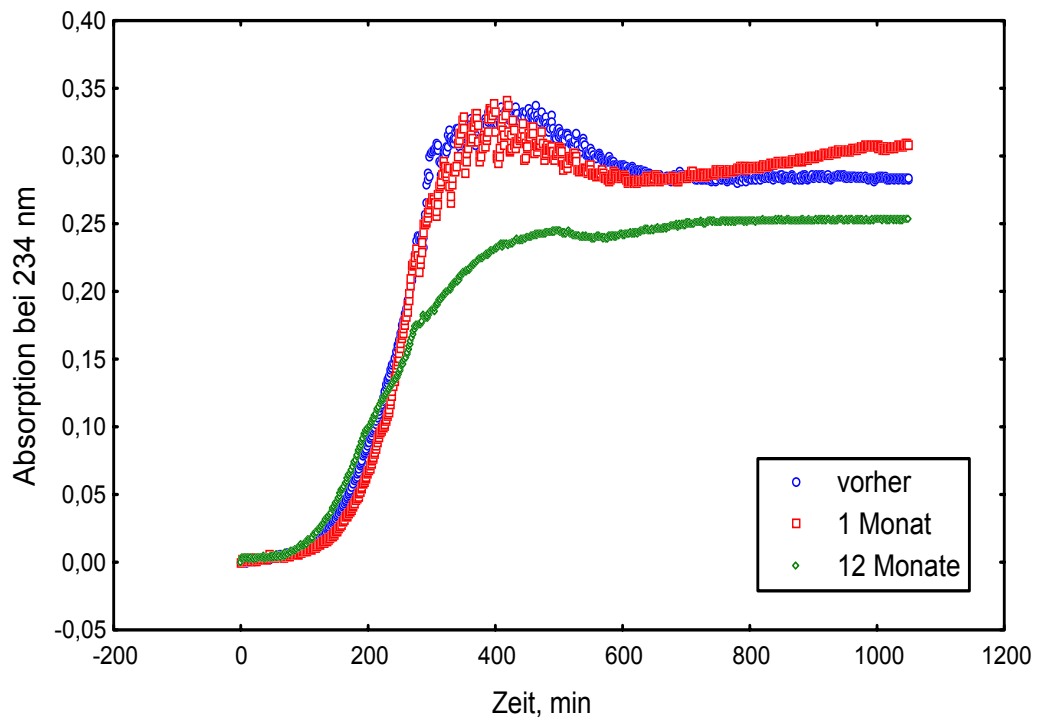
Abbildung 5: Oxidationskurven im Liquor; Zeitpunkte vor Vitamingabe, einen Monat und 12 Monate mit Vitamingabe; Autooxidation; Einzeldarstellungen



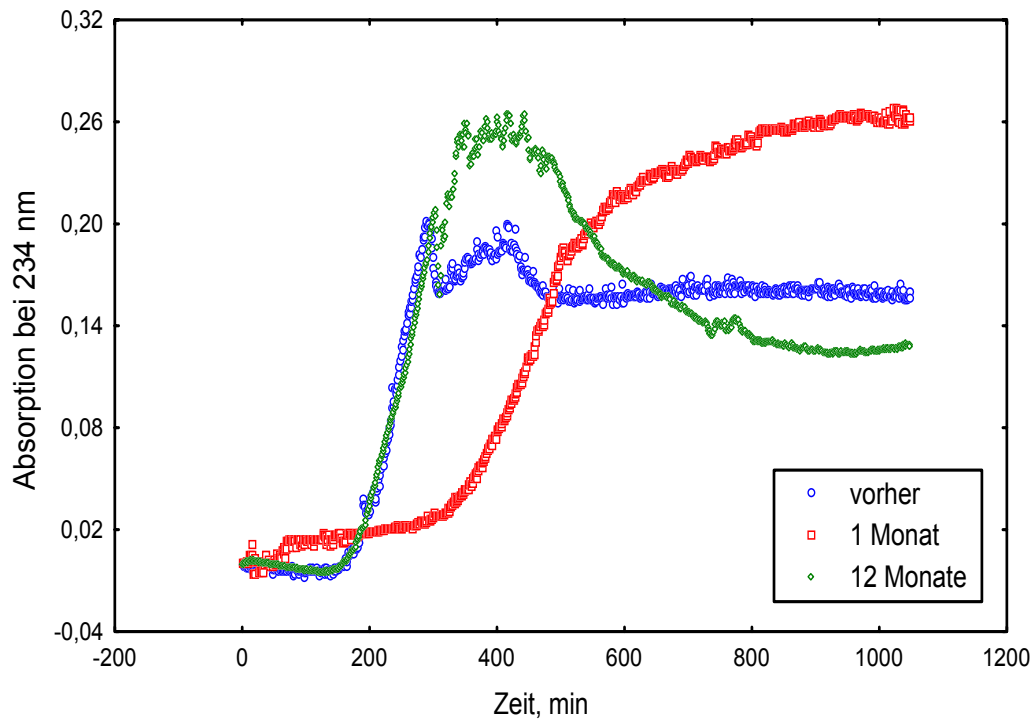
Autooxidation, Liquor, Patient 309



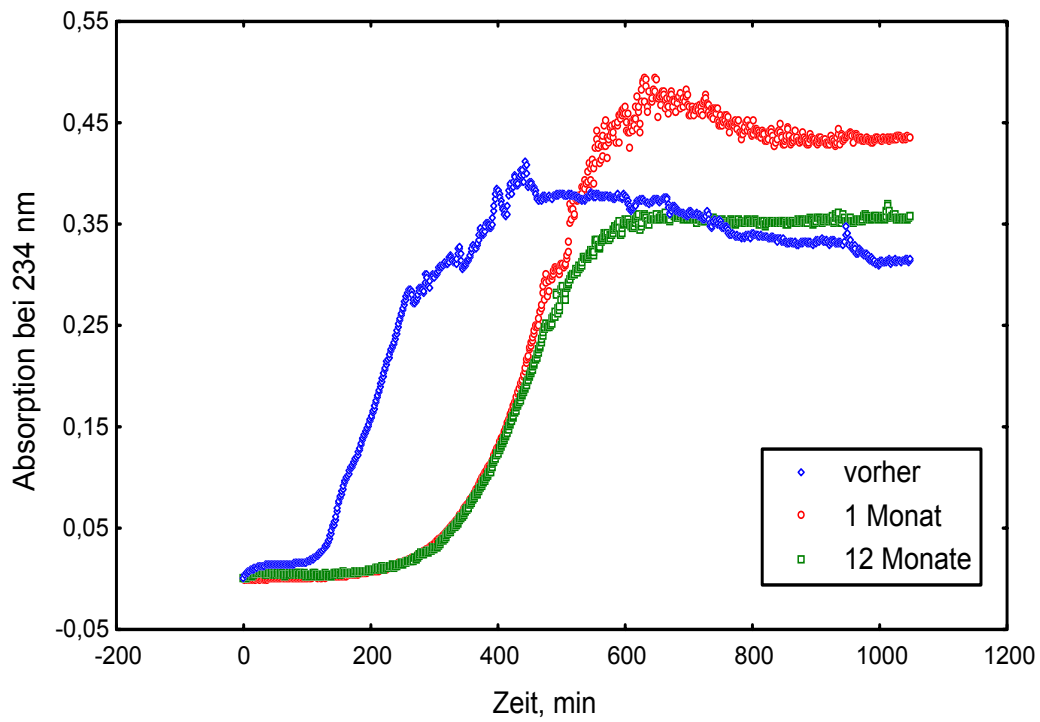
Autooxidation, Liquor, Patient 339



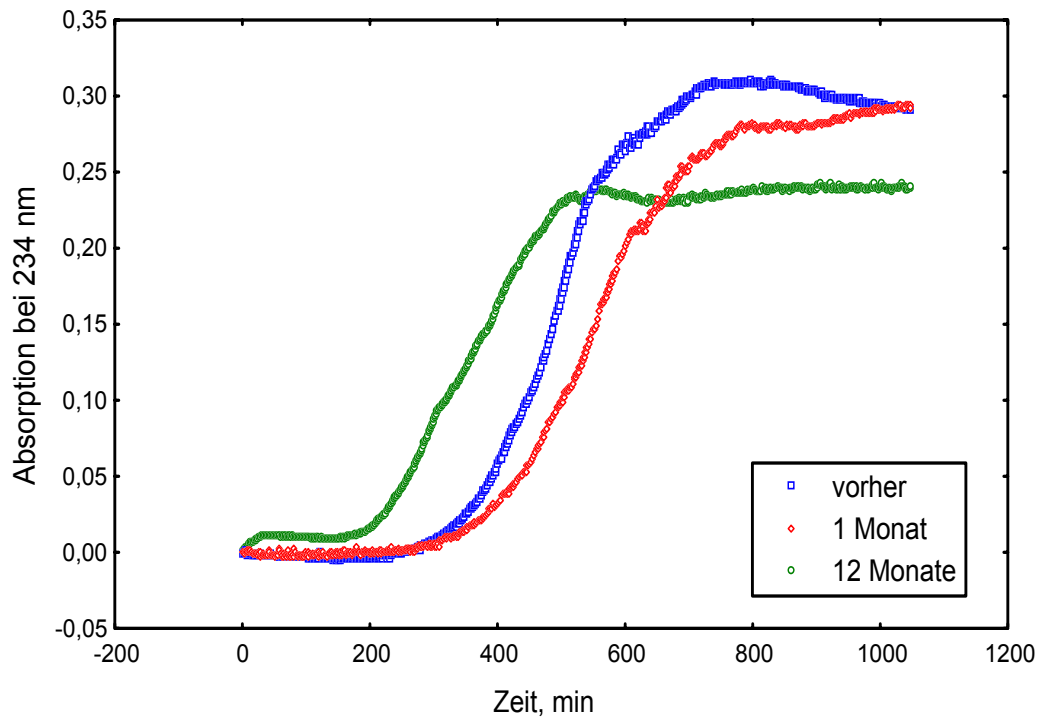
Autooxidation, Liquor, Patient 352



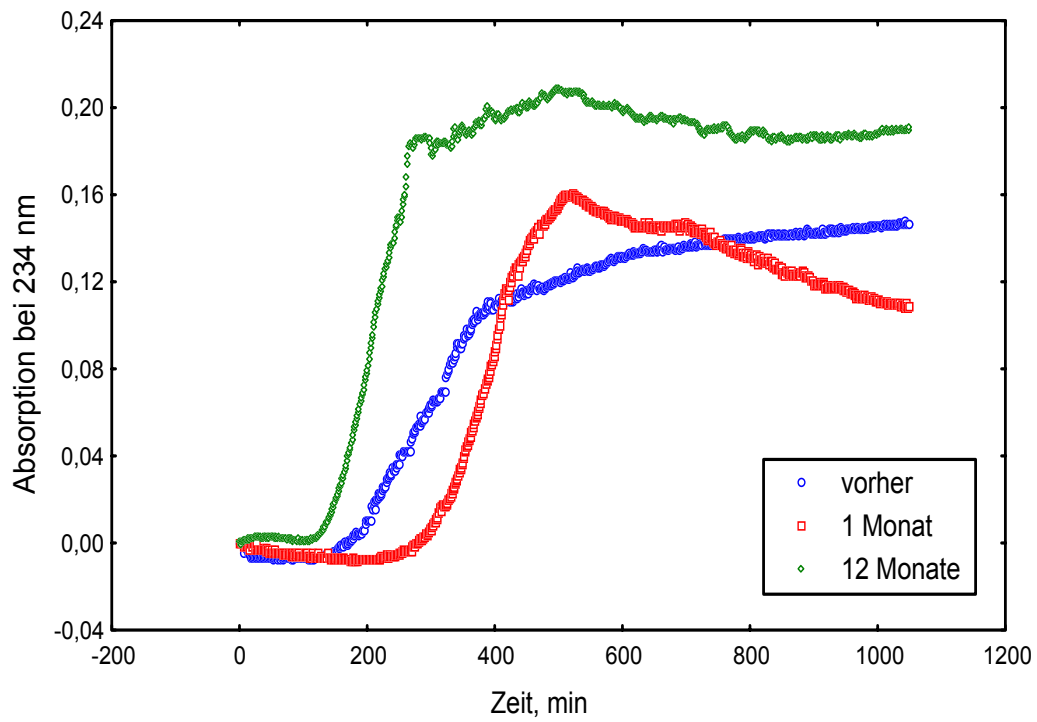
Autooxidation, Liquor, Patient 354



Autooxidation, Liquor, Patient 360



Autooxidation, Liquor, Patient 361



Autooxidation, Liquor, Patient 374

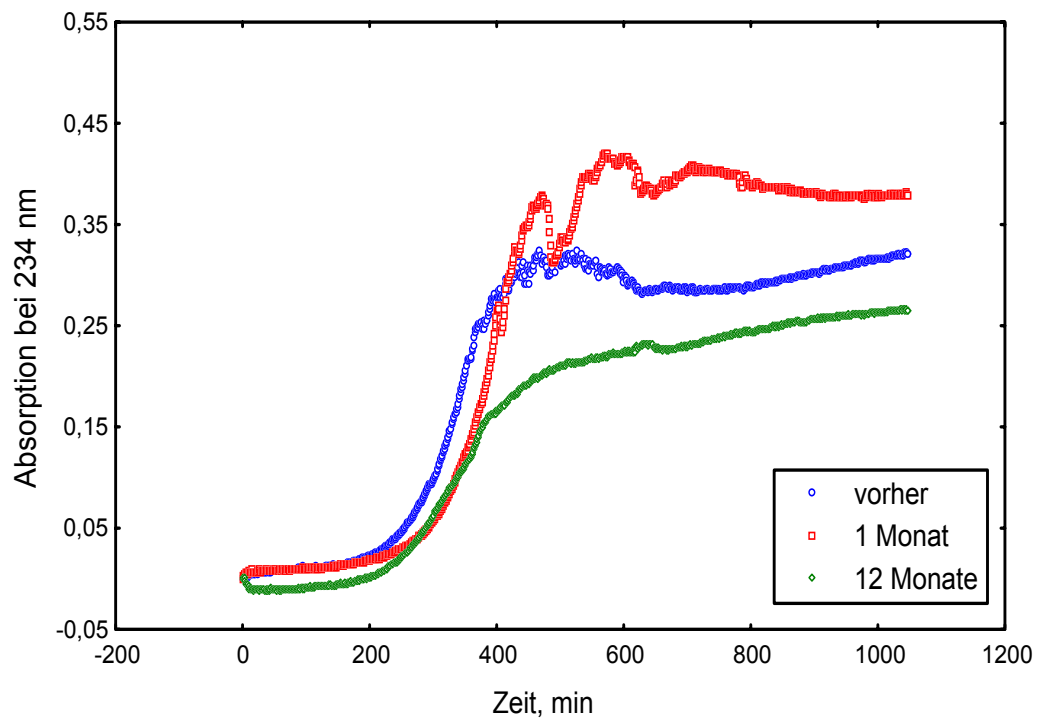
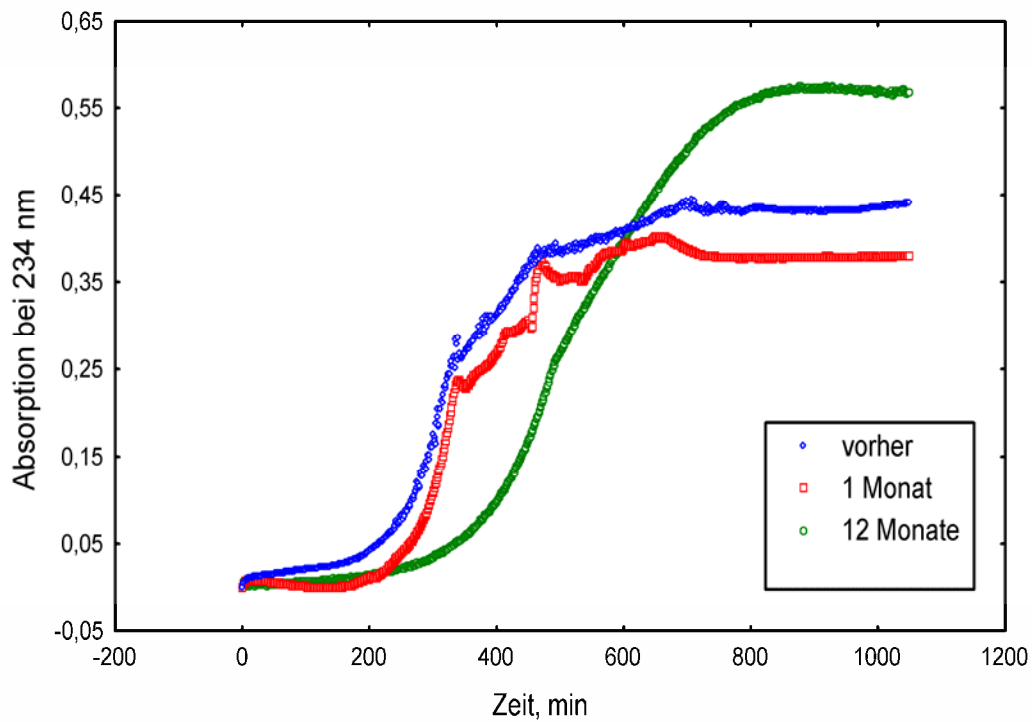
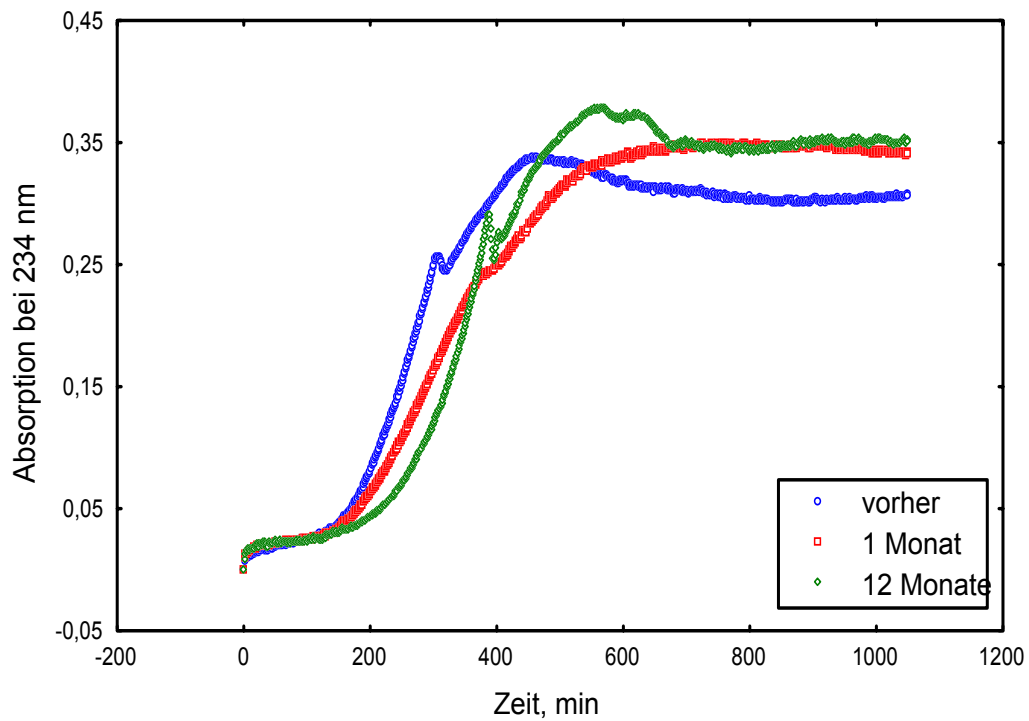


Abbildung 6: Oxidationskurven im Liquor; Zeitpunkte vor Vitamingabe, einen Monat und 12 Monate mit Vitamingabe; Oxidation mit AAPH; Einzeldarstellungen

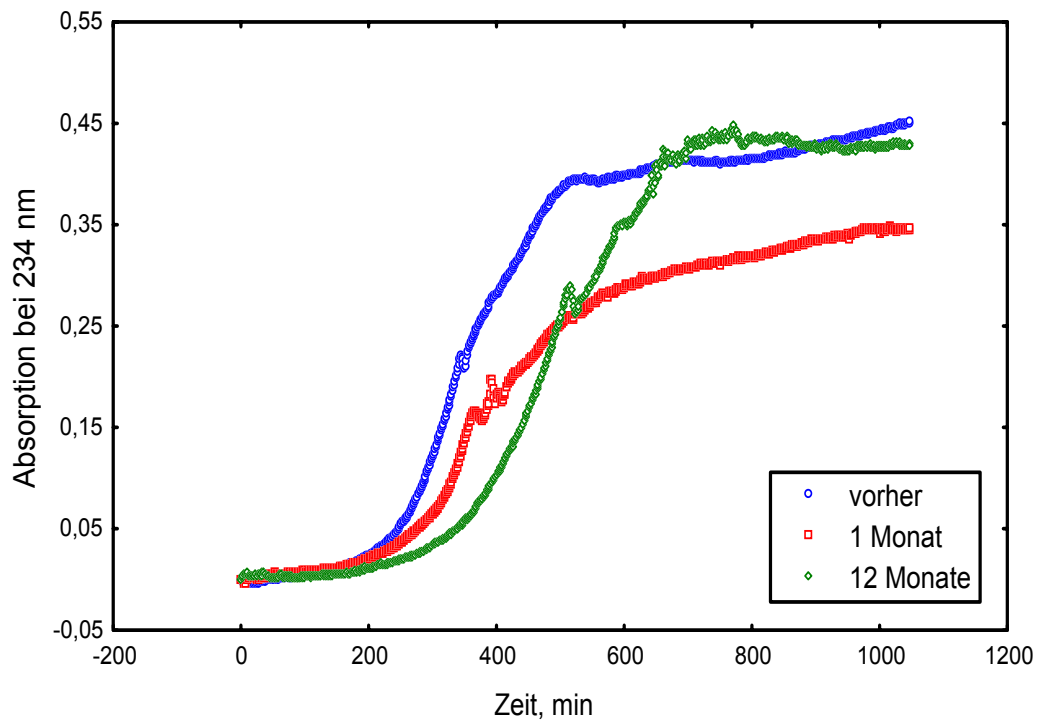
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 319



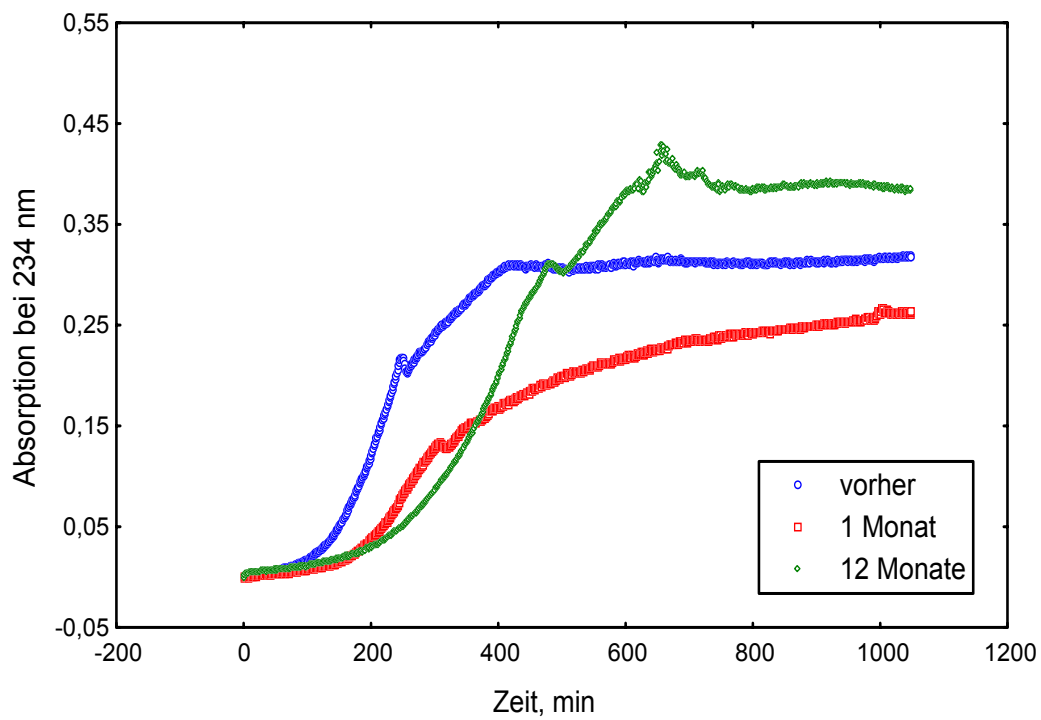
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 054



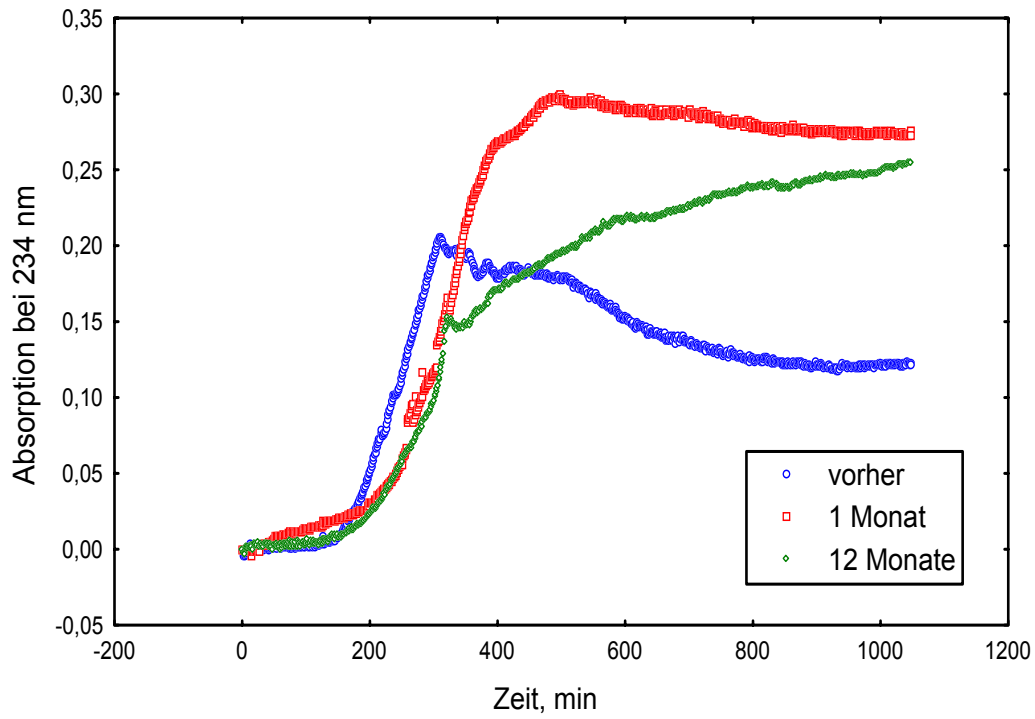
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 309



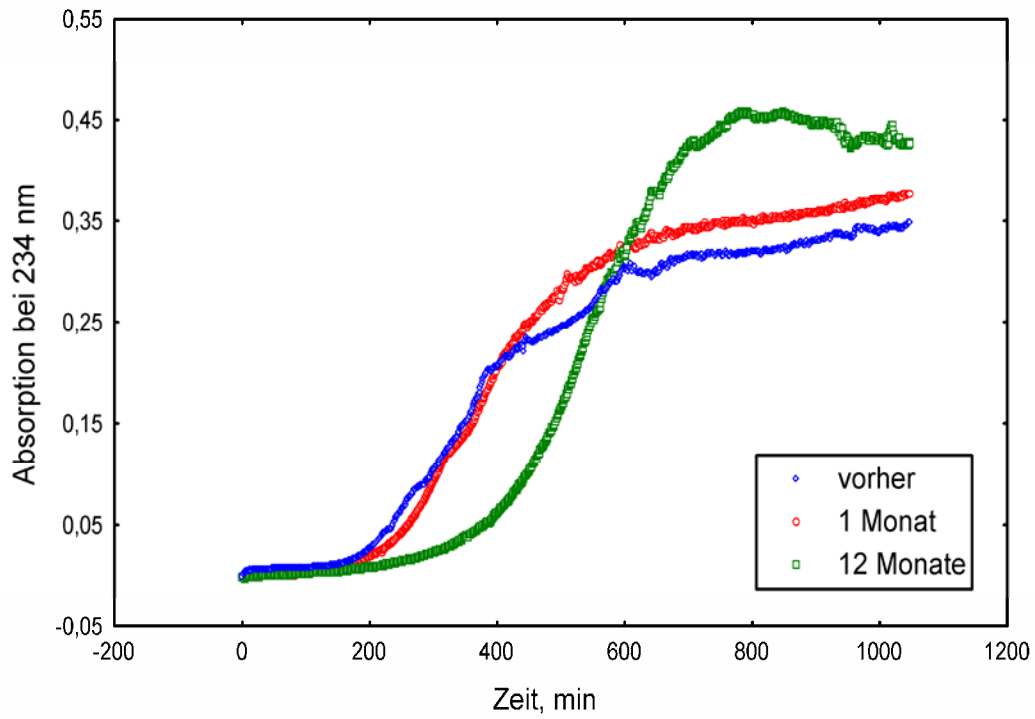
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 339



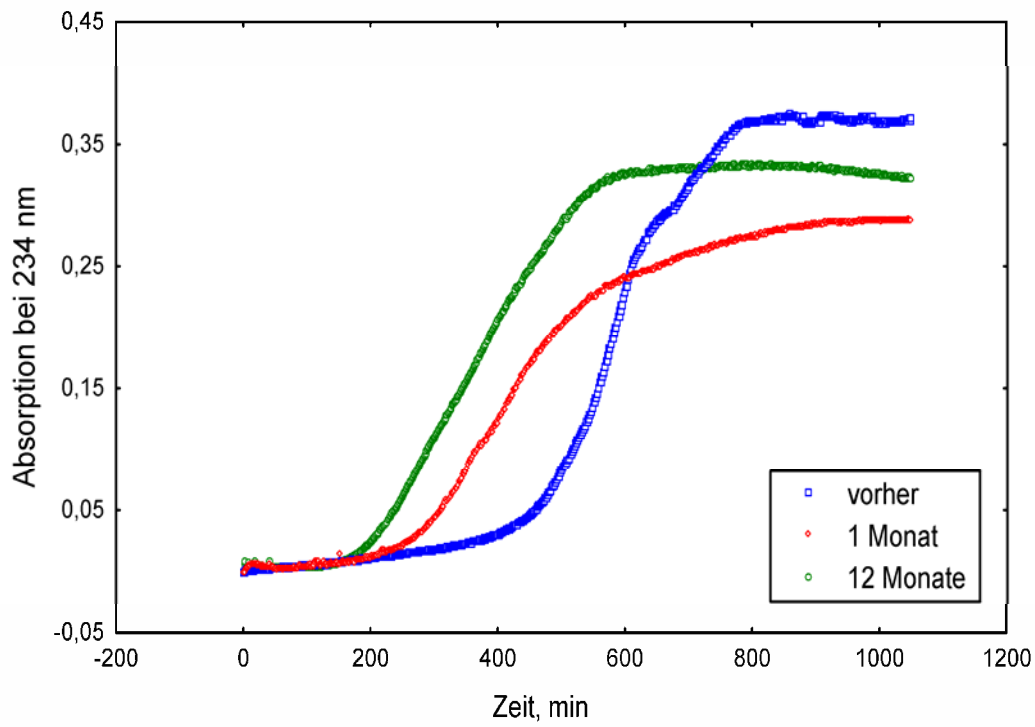
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 352



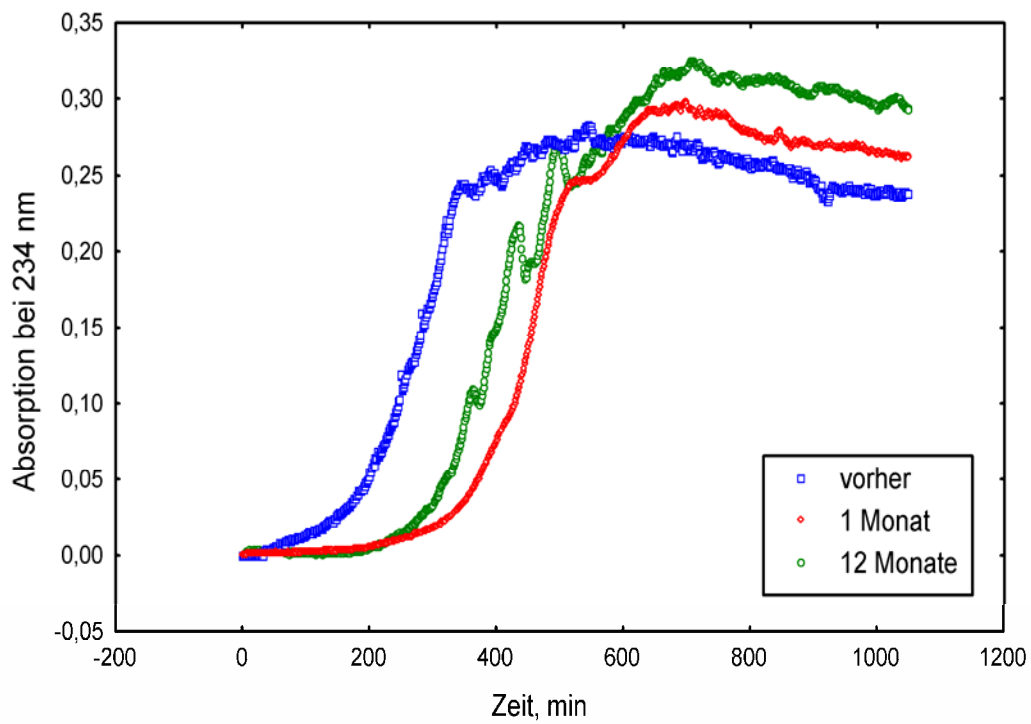
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 354



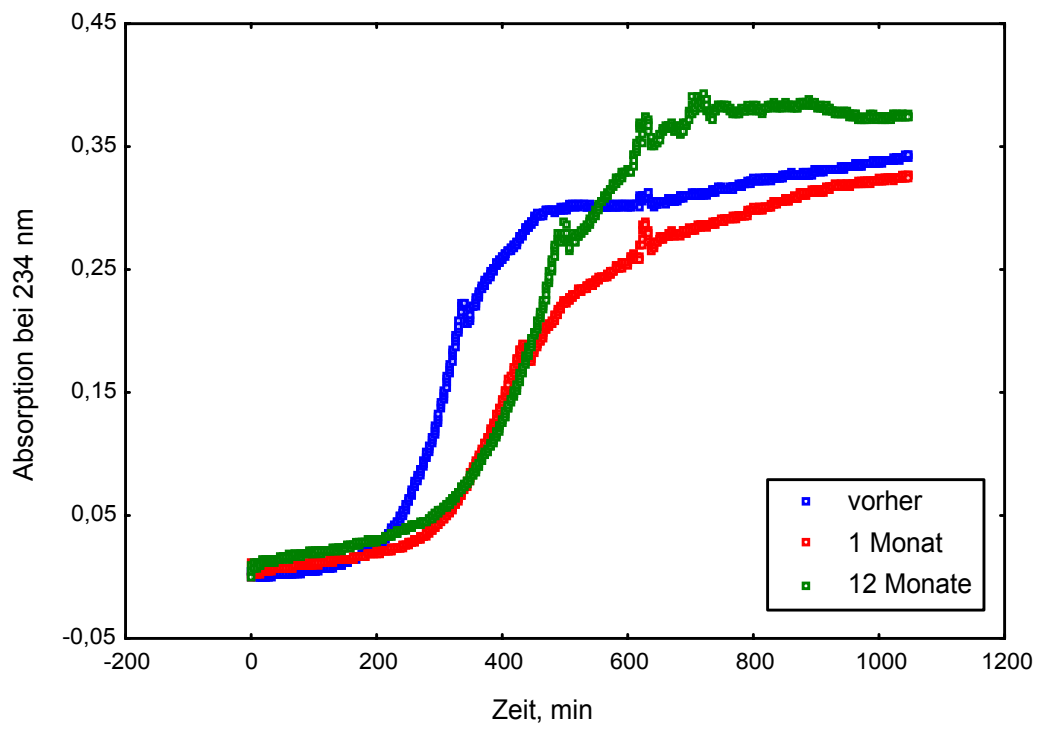
Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 360



Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 361



Oxidation mit AAPH, Liquor, Patient 374



Danksagung

Zur Durchführung meiner Arbeit habe ich im Labor der Molekularen Zellbiologie von Frau Professor Beisiegel viel Unterstützung und eine herzliche Aufnahme erfahren.

Dafür gilt in erster Linie mein Dank an Frau Professor Beisiegel, deren konstruktiver Rat meiner Arbeit wiederholt neuen Anstoß gegeben hat, und deren wöchentliche Laborbesprechungen ich als sehr motivierend und lehrreich empfand.

Einen großen Dank möchte ich Sönke, dem Betreuer meiner Doktorarbeit, aussprechen. Neben dem freundschaftlichen Verhältnis, das er mir angeboten hat, hatte er stets ein offenes Ohr für meine Fragen und hat mich in vielfältiger Weise unterstützt.

Ein ebensolcher Dank geht an die Mitarbeiter des Labors, worunter ich mich besonders bei Dieter, Dorte und Nico bedanken möchte. Sie haben mir ihre Hilfeleistung, vor allem materieller und technischer Art, großzügig angeboten. Vor allem Dieter hat mir viel Zeit bei Problemen mit den technischen Geräten gewidmet.

Neben meinem Dank an alle anderen Mitarbeiter des Labors, die hier nicht namentlich genannt sind, für den herzlichen und freundschaftlichen Umgang miteinander, der die langen Labortage zu einem angenehmen Erlebnis werden lässt, nicht zuletzt ein großes Dankeschön an Christine, die dazu einen ganz wesentlichen Beitrag leistet.

Lebenslauf

Name	Katrin Semmler-Tazzioli
Geburtsdatum, -ort	7. April 1977 in Weimar
Familie	verheiratet seit 2004 2 Kinder (2002, 2004)
Schulbildung	• 1983-1991 Polytechnische Oberschule, Gröna/Sa. • 1991-1996 Gymnasium "An der Hohen Straße", Chemnitz • 1994-1995 Highschool-Austauschjahr, Birmingham, USA • 1996 Abitur
Studium	• 1996-1997 Studium der Psychologie, Strasbourg, Frankreich • ab April 1997 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg • März 1999 Physikum • März 2000 Erstes Staatsexamen • September 2002 Zweites Staatsexamen • ab Oktober 2002 Humanmedizin Charité, Humboldt-Universität Berlin • April 2004 Drittes Staatsexamen • 04.06.2004 mündliche Prüfung, Annahme Dissertation

Eidesstattliche Versicherung

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

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