

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Harald Klüter)

Thrombozytäre und inflammatorische Merkmale bei Alzheimer-Patienten
und deren Beeinflussung durch Acetylcholinesterase-Inhibitoren

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Isabella Catharina Wiest
aus
Ludwigsburg
2020

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Bugert

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Die Alzheimer- Erkrankung.....	3
1.1.1 Definition, Epidemiologie und klinische Präsentation	4
1.1.2 Pathophysiologie.....	6
1.1.3 Therapieansätze	19
1.2 Thrombozyten und die Alzheimer-Erkrankung.....	21
1.2.1 Thrombozyten als neuronales Modell.....	21
1.2.2 Akteure der Alzheimer-Pathophysiologie in Thrombozyten	22
1.2.3 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ auf Thrombozyten	24
1.2.4 Thrombozytäre Veränderungen bei AD.....	25
1.2.5 Einfluss anticholinergischer Medikamente auf Thrombozyten	26
1.2.6 Thrombozytäre Biomarker für die Alzheimer-Diagnose	26
1.3 Inflammation im Blut der Alzheimer-Patienten.....	29
1.4 Hypothesen und Zielsetzung	30
2 MATERIAL UND METHODEN.....	33
2.1 Studiendesign.....	33
2.1.1 Rekrutierung der Studienpopulation	33
2.1.2 Ethikantrag.....	34
2.1.3 Finanzierung	34
2.2 Material.....	34
2.2.1 Chemikalien	34
2.2.2 Gebrauchsfertige Kits.....	35
2.2.3 Kommerzielle Antikörper	36
2.2.4 Verbrauchsmaterialien	36
2.2.5 Geräte mit Workstations und Software.....	36
2.3 Methoden.....	37
2.3.1 Gewinnung des Blutes und Präparation der Thrombozyten	37
2.3.2 Messung der Thrombozytenaggregation.....	38
2.3.3 Durchflusszytometrie.....	42
2.3.4 Bestimmung des Inflammationsniveaus	44
2.3.5 Patientenausschluss	46
2.4 Statistische Auswertung.....	47

2.4.1	Gruppierung der Verlaufsmessungen.....	47
2.4.2	Gruppenvergleich der Kontrollen mit Alzheimer-Patienten	50
2.4.3	Analyse der thrombozytären Merkmale abhängig vom Therapiestatus	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Deskriptive Ergebnisse zur Studienpopulation	52
3.2	Thrombozytenaggregation im Multiplate®	53
3.2.1	Unbehandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen	53
3.2.2	Behandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen ..	55
3.2.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Thrombozytenaggregation	59
3.3	Thrombozytendegranulation	60
3.3.1	Unbehandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen	60
3.3.2	Behandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen ..	61
3.4	Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors	64
3.5	Blutbild von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen	64
3.5.1	Thrombozytenzahl und -indizes	64
3.5.2	Erythrozytenkennzahlen und Hämoglobin	65
3.5.3	Unterschiede im Blutbild zwischen männlichen und weiblichen Patienten	69
3.6	Inflammatorisches Niveau.....	71
4	DISKUSSION	74
4.1	Einordnung der Studienpopulation	74
4.2	Thrombozytenaggregation und -degranulation	75
4.2.1	Unbehandelte Alzheimer-Patienten vs. gesunde Kontrollen.....	76
4.2.2	Thrombozytenaggregation und -degranulation unter AChE-I Therapie	85
4.3	Veränderungen in Thrombozytenzahl und -indizes	89
4.4	Veränderungen im Blutbild der Alzheimer Patienten	91
4.5	Veränderungen im inflammatorischen Niveau	94
4.6	Geschlechterspezifische Unterschiede	98
4.7	Medikamentenprofil.....	100
4.8	Fazit und Ausblick	102
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	106
6	LITERATURVERZEICHNIS	108
7	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	134
8	LEBENS LAUF	137
9	DANKSAGUNG	139

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Arachidonsäure
A β	Amyloid β
ACh	Acetylcholin
AChE-I	Acetylcholinesterase-Inhibitor
AD	Alzheimer-Erkrankung, Alzheimer-Demenz Englisch: Alzheimer's disease
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	Intrazelluläre Domäne des Amyloidvorläuferproteins Englisch: Amyloid precursor protein intracellular domain
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein Englisch: Amyloid precursor protein
ASS	Acetylsalicylsäure
BACE	Beta-Sekretase
CAA	Zerebrale Amyloid Angiopathie
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CHAT	Cholinacetyltransferase
α CTF	α – C-terminales Fragment
β CTF	β – C-terminales Fragment
EOAD	Präsenile Alzheimer-Erkrankung Englisch: Early-onset Alzheimer's disease
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase 3 β
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL- 6	Interleukin 6
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte Englisch: Low-density lipoprotein
LOAD	Senile Alzheimer-Erkrankung Englisch: Late-onset Alzheimer's disease
LRP	LDL-Rezeptor-verwandtes Protein Englisch: Low density lipoprotein receptor related protein
MCI	Milde kognitive Beeinträchtigung Englisch: Mild cognitive impairment
MMSE	Mini-Mental State Test/Examination

nAChR α 7	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor α 7
NaCl	Natriumchlorid
NBM	Nucleus basalis Meynert
NFT	Neurofibrilläre Bündel; Englisch: neurofibrillary tangles
NSAID	Nicht-steroidale Antirheumatika
PE	Phycoerythrin
P-GP	P-Glykoprotein
PLA2	Phospholipase A2
PNS	Peripheres Nervensystem
PRP	Plättchen-reiches Plasma
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TMT	Zahlenverbindungstest; Englisch: Trail-making Test
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
U46619	Thromboxan A2 Analogon U46619
WMS	Wechsler Memory Skala
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Die Alzheimer- Erkrankung

Historisch war die Alzheimer-Demenz (AD) landläufig unter „Altersblödsinn“ bekannt, bis der Neurologe Alois Alzheimer erstmals eine biologische Ursache für dieses Krankheitsbild vermutete. Er hatte diesen Verdacht, nachdem er das Gehirn seiner Patientin, Auguste Deter, seziierte, die im Alter von nur 65 Jahren verstorben war^{1, 2}. In ihrem Gehirn stellte er „Eiweißablagerungen“ und eine „geschrumpfte Hirnrinde“ fest, woraufhin sein Vorgesetzter Dr. Emil Kraepelin das Krankheitsbild in einem Lehrbuch 1910 erstmals „Alzheimer'sche Krankheit“ nannte³. Erst in den 1960er Jahren wurde der Erkrankung in der Wissenschaft vermehrt Bedeutung geschenkt, doch bis heute bleibt ein umfassendes pathophysiologisches Modell unerschlossen^{4, 5}.

Ein relevanter Risikofaktor für die Alzheimer-Erkrankung ist das Alter⁶, sodass die Prävalenz der Erkrankung in der alternden Bevölkerung stetig steigt. Der Welt-Alzheimer-Report 2015 erwartet, dass im Jahr 2030 weltweit 74,7 Millionen Menschen an einer Demenz leiden werden, der Großteil darunter an der Alzheimer-Demenz⁷. Pathogenetisch stehen das Protein Amyloid β ($A\beta$) und die Tau-Fibrillen (NFT (=Neurofibrillary tangles, neurofibrilläre Bündel)) im Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen. Das Protein $A\beta$ akkumuliert intra- und extrazellulär im Gehirn der Alzheimer-Patienten und wird maßgeblich für den Neuronenuntergang und den damit einhergehenden Verlust der kognitiven Leistung verantwortlich gemacht. Eine wichtige pathophysiologische Erkenntnis für die vorliegende Arbeit ist, dass $A\beta$ und das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) auch im peripheren Blut vorkommen und dort bei Alzheimer-Erkrankten Veränderungen aufweisen. Die hauptsächliche Quelle für $A\beta$ im Blut sind Thrombozyten. Auch die NFTs, die eine entscheidende Rolle im Metabolismus und der Signaltransduktion von Neuronen spielen, kommen im Thrombozyten vor. Zudem ähneln sich Thrombozyten und Neuronen in Rezeptorprofil und Signaltransduktion, sowie der Sekretion von Botenstoffen und tragen vermutlich auch über eine zerebrale Amyloidangiopathie, einer Ablagerung von $A\beta$ in den Wänden der Blutgefäße, zur AD-Pathologie bei⁸.

1.1.1 Definition, Epidemiologie und klinische Präsentation

Definition und Epidemiologie

Die Alzheimer-Demenz gehört zu den primär degenerativen Demenzen und ist von sekundären Demenzsyndromen, die im Rahmen anderer Erkrankungen auftreten, abzugrenzen (z.B. Demenzsyndrome durch Traumata, Blutungen oder Tumoren sowie metabolischen (z.B. im Rahmen einer hepatischen Enzephalopathie) oder entzündlichen Erkrankungen (z.B. HIV-Enzephalitis)). Sie ist die häufigste primäre Demenzform, gefolgt von der vaskulären Demenz². Beide Demenzformen weisen viele Überlappungen auf, sodass es fraglich ist, ob die vaskuläre Demenz als eigene Entität zu werten ist, oder ein „second-hit“ in Form von vaskulären Schäden bei vorliegender AD-Pathologie zur Dekompensation führt^{2, 9, 10}.

Die AD präsentiert sich in zwei klinischen Varianten: In der sich früh manifestierenden Variante (early-onset, EOAD, präsenil) und der Variante, die sich erst im höheren Alter manifestiert (late-onset, LOAD, senil). Hierbei bestimmt allein das Alter die Definition: Vor 65 Lebensjahren spricht man von EOAD, im Alter von über 65 Jahren von LOAD¹¹. 95% der AD sind LOAD, 5% EOAD¹². Bei den frühen AD-Formen geht man von einer stärkeren genetischen Assoziation aus, allerdings sind autosomal dominant vererbte Veränderungen einzelner Gene nur sehr selten für das Auftreten einer AD verantwortlich. In den meisten Fällen, besonders der LOAD, handelt es sich um eine komplexe Kombination aus genetischen und umweltbezogenen Faktoren^{13, 14}.

Die Prävalenz der AD steigt mit dem Alter an, bei über 85-Jährigen liegt sie bei ca. 30%-40%^{2, 15}. Frauen sind häufiger betroffen, was möglicherweise an der höheren Lebenserwartung liegt. Neuere Studien schließen auch eine Beteiligung der Sexualhormone und des Östrogenrezeptors in zahlreichen Hirnfunktionen in das Erklärungsmodell mit ein¹⁶.

Ferri et al. schätzten eine weltweite Prävalenz der Demenz von 24 Millionen im Jahr 2005 und erwarteten eine Erhöhung bis zur annähernden Verdopplung auf 42 Millionen für das Jahr 2020. 60% der Erkrankten leben in Entwicklungsländern¹. Die mittlere Lebensdauer nach Diagnosestellung beträgt 8 Jahre, kann aber stark variieren. Die Todesursachen von Alzheimer-Patienten sind häufig Infektionen, die durch die zunehmende Pflegebedürftigkeit begünstigt werden².

Risikofaktoren und „Mild cognitive impairment“

Ätiologisch findet die Wissenschaft zahlreiche Erklärungsmodelle für *Contributio* und *Correlatio*, Kausalzusammenhänge allerdings sind bislang ungeklärt. Die bislang erarbeiteten wissenschaftlichen Erkenntnisse legen die Beteiligung einiger zentraler Proteine und Botenstoffsysteme nahe, auf die in den folgenden Kapiteln eingegangen werden soll.

Als Risikofaktoren sind bestimmte genotypische Varianten des Apolipoprotein E (ApoE), einer physiologischen Komponente des Lipoproteinstoffwechsel, zu nennen. Am häufigsten kommt die Isoform ApoE ϵ 3 in der Population vor, bei Vorliegen des Epsilon Allels 4 (ApoE ϵ 4), besteht ein erhöhtes Risiko, eine AD zu entwickeln (ca. 50% der LOAD-Patienten weisen das ApoE ϵ 4 Allel auf, wohingegen gesunde Kontrollen nur 20-25% ApoE ϵ 4 exprimieren)¹⁷⁻¹⁹. Ebenso tritt bei ApoE ϵ 4-Trägern die AD ein bis zwei Dekaden früher auf¹⁷. ApoE interagiert mit A β , dabei beschleunigt insbesondere ApoE ϵ 4 dessen Aggregation, wohingegen ApoE ϵ 2-Träger ein eher verringertes Risiko der AD-Entwicklung aufwiesen¹⁹. Dennoch zeigen sich die durch ApoE ϵ 4 vermittelten pathophysiologischen Effekte auch unabhängig von A β und es kann nicht von einer monogenetischen Erkrankung ausgegangen werden²⁰. Somit ist ApoE ϵ 4 weder notwendig noch hinreichend, um eine AD zu entwickeln, wodurch eine alleinige AD-Diagnostik über die Genotypisierung nicht möglich ist^{19, 21}. Weitere Gendefekte oder -mutationen, die besonders mit der präsenilen (EOAD) AD assoziiert sind, sind das Presenilin-1-Gen, (Chromosom 14), Presenilin-2-Gen (Chromosom 1) und das Amyloid Precursor Protein (APP(Amyloid-precursor protein)) (Chromosom 21)¹³.

Ein erhöhtes Risiko, an einer Alzheimer Demenz zu erkranken besteht auch beim Vorliegen einer milden kognitiven Beeinträchtigung, dem sogenannten „mild cognitive impairment“ (MCI), besonders des amnestischen MCI. Hierbei handelt es sich um einen Abbau kognitiver Leistungen meist im episodischen Gedächtnis (Merkfähigkeit), der über das Maß einer Alterserscheinung hinausgeht und auch durch neuropsychologische Untersuchungen objektivierbar ist. Es ist nur eine kognitive Domäne betroffen und Alltagsaktivitäten können noch weiter wahrgenommen werden, wodurch sich das MCI von der manifesten Demenz unterscheidet².

Als protektive Faktoren bezüglich der AD gelten vor allem ein höherer Bildungsgrad und ein hohes Maß an psychosozialer Aktivität, vermutlich da aufgrund der damit

einhergehenden neuronalen Plastizität mehr Neurone untergehen müssen, bevor die Erkrankung symptomatisch wird^{22, 23}.

Betroffene Hirnregion

Bei der AD zeigt sich eine Hirnatrophie vor allem im parieto-temporalen und frontalen Kortex^{2, 24}. Besonders neuronale Verbindungen zwischen hippocampalem und parahippocampalem Kortex gehen verloren². Diese Areale leisten räumliche Verarbeitung, aber auch die Verarbeitung von Emotionen, Verhaltenseindrücken, sowie Wahrnehmungen von Personen, Objekten und Geräuschen²⁵.

Symptomatik

In erster Linie äußert sich die AD in einem Verlust des episodischen Gedächtnisses und anderer global integrativer Hirnfunktionen. Darüber hinaus kann die AD auch mit mildem Gedächtnisverlust oder als Syndrom mit fokalen Veränderungen, wie z.B. einer Apraxie, oder einer Verschlechterung der Sprache oder des Visus einher gehen¹¹. Oft treten Verwirrung, Sprachveränderungen und Sehveränderungen auf¹². Die senile Form (LOAD) zeichnet sich durch einen langsameren Progress aus und äußert sich meist zuerst in zunehmender Vergesslichkeit, wohingegen die EOAD schnell voranschreitet und andere Symptome wie z.B. die Apraxie vor dem Gedächtnisverlust stehen. Patienten mit LOAD weisen einen ausgeprägten Verlust hippocampaler Strukturen auf, während diese Areale bei EOAD weniger beeinträchtigt sind, aber eine frontale/temporoparietale Atrophie vorherrscht¹¹.

1.1.2 Pathophysiologie

Verschiedene Hypothesen beschäftigen sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung, aber keine von ihnen ist als umfassender Erklärungsansatz komplett belegt. Alle Hypothesen integrieren A β als Schlüsselement, auch wenn sich die pathophysiologische Rolle in den unterschiedlichen Hypothesen unterscheidet²⁶. So existiert neben der Amyloid-Hypothese die Hypothese der Oligomerkaskade, die sich auf die Prionen-ähnlichen Eigenschaften der löslichen Amyloid-Oligomere bezieht. Auf beide Hypothesen soll im Folgenden genauer eingegangen werden. Danach soll die Tau-Hypothese erläutert werden, in der intrazelluläre NFTs zentrale Akteure sind.

Zudem soll die Rolle des cholinergen Systems erörtert werden. Die Metallionen-Hypothese und die Hypothese zum oxidativen Stress sollen hier der Vollständigkeit halber erwähnt, aber nicht weiter ausgeführt werden. Die wachsende Evidenz über die AD beweist, dass die Erkrankung hochgradig komplex und multikausal ist. Veränderungen im Blut, Immunsystem und Stoffwechsel bilden, zusätzlich zu den historisch im Vordergrund stehenden neurologischen und genetischen Alterationen, Risikofaktoren und Schlüsselemente der Pathophysiologie ab, deren Verknüpfung noch nicht eindeutig geklärt ist²⁷.

1.1.2.1 Amyloid- β

Die ersten Erklärungsansätze und auch die bis heute vorherrschende Theorie zur Alzheimer-Pathophysiologie fußt auf der A β -Hypothese. Es lassen sich drei pathologische Anhäufungen des A β bei Alzheimer-Patienten konstatieren:

1. A β in Form von extrazellulären, senilen Plaques, die sich in der grauen Substanz ablagern
2. Intrazellulär akkumulierendes A β
3. Zerebrale Amyloid Angiopathie (CAA), die Ablagerung des A β in der Wand von zerebralen Blutgefäßen

A β ist ein fehlgefaltetes Protein in der β -Faltblatt-Struktur, mit einer Länge 39-42 Aminosäuren^{28,29}. Das A β in gesunden Gehirnen ist niedriger, im picomolaren Bereich, konzentriert. Je nach Länge des A β -Proteins unterscheidet es sich in Toxizität und Akkumulationsfähigkeit³⁰. Im experimentellen Setting beschleunigen höhermolekulare A β -Formen den Aggregationsprozess und induzieren prionenartige Eigenschaften des A β mit der Folge, dass eine künstliche A β -Aussaat im Gehirn eine A β -Proliferation bewirken kann³¹⁻³⁴.

A β findet sich extrazellulär in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten in Form von sogenannten senilen Plaques³⁴. Es entsteht durch Abspaltung vom APP, das auf Chromosom 21 codiert ist^{34,35}. Passend hierzu findet sich ein vermehrtes Vorkommen von neurodegenerativen Erkrankungen bei Trisomie 21^{36,37}. Das APP ist ein integrales Transmembranprotein vieler Gewebe, auch in Gesunden, und kann durch drei proteolytische Enzyme gespalten werden, die alpha-, beta- und gamma- Sekretase³⁸. Bei der Spaltung wird ein nicht-amyloidogener Weg, der nicht zur Entstehung von A β

führt, vom amyloidogenen Spaltungsweg, der zur Entstehung von A β führt, unterschieden (Tabelle 1).

Tabelle 1 – APP-spaltende Sekretasen mit Schnittstelle und Funktion

Sekretasen	Schnittregion im APP	Folge
Alpha-	Extrazellulärer Teil	Freisetzung des N-terminalen Teils in den Extrazellulärraum (sAPP): 1. Schritt im <u>nicht-amyloidogenen Weg</u> : Ergebnis: sAPP α + α CTF
Beta-	N-terminus-A β	1. Schritt in der <u>Aβ-Genese</u> : „Vorbereitung“ für gamma-Sekretase Ergebnis: APPs β + β CTF
Gamma-	Carboxyterminus A β	2. Schritt in der <u>Aβ-Genese</u> : Gamma-Sekretase fertigt 40/42 Aminosäuren langes A-beta-Peptid aus APPs β Ergebnis: A β + AICD 2. Schritt im <u>nicht-amyloidogenen Weg</u> Freisetzung des P3-Peptids nach Spaltung des α CTF

A β – Amyloid β ; APP – Amyloid-Vorläuferprotein; CTF – C-terminales Fragment; AICD – intrazelluläre Domäne des Amyloid-Vorläuferproteins; Informationen aus Ref. ^{26, 38}

Lange Zeit ging man davon aus, dass das A β ein reines Abfallprodukt, ein fehlgefaltetes Protein ohne Funktion darstellt. Neuere Studien legen wiederum eine physiologische Funktion des A β in der Hämostase und dem Immunsystem nahe³⁹⁻⁴¹. Außerdem sind A β - Mono-/Oligomere an der Genese von Neuronen, synaptischer Plastizität, der Calciumhomöostase und der Gedächtnisbildung beteiligt und haben in niedrigen Konzentrationen anti-oxidative Wirkung^{42, 43}.

Auch für das APP ist die physiologische Funktion noch nicht eindeutig geklärt, aber verschiedenen Studien legen eine Beteiligung an der intrazellulären Calcium-⁴⁴, der Metallionen-Homöostase⁴⁵, am Zellwachstum⁴⁶ und der Cholesterinbindung⁴⁷ nahe. Weiterhin gibt es Hinweise, dass das APP als Modulator der Zelladhäsion und Fibroblasten Proliferation aktiv sein könnte^{34, 42, 46}.

Struktur und Ablagerungsort des A β

In vitro bilden A β -Peptide polymorphe Fibrillen, die molekularen Strukturen hängen aber von verschiedenen Wachstums- und Umgebungskonditionen ab und unterscheiden sich sowohl von in vitro zu in vivo, als auch interindividuell unter AD-Patienten²⁸. Noch immer ist nicht bekannt, was genau die Toxizität von A β ausmacht. Es sind weder allein die Dichte der A β -Plaques, noch die Menge von A β , die die kognitiven Fähigkeiten beeinflussen³⁴. Fraglich ist, ob die Ablagerung von A β -Fibrillen für Neuronenuntergang sorgen, oder aber lösliche A β -Oligomere eine Fehlfunktion der Synapsen mit Auswirkung auf Langzeitpotenzierung und synaptische Plastizität hervorrufen⁴⁸. Außerdem litten in Untersuchungen nicht alle Patienten, die extrazelluläre A β -Akkumulationen post-mortem aufweisen, auch ante-mortem unter den Symptomen der Alzheimer- Demenz⁴⁹. Auch hier ist fraglich, ob sich diese Patienten in einem frühen Stadium der Erkrankung befanden, oder A β -Ablagerungen keine hinreichende Pathologie für die AD darstellen.

Es ist bekannt, dass nicht nur extrazelluläre senile Plaques in der AD-Pathologie eine Rolle spielen, sondern A β auch intrazellulär vorkommt, sowohl in Zellen mit NFTs als auch in anderen neuronalen Zellen^{50, 51}. Die intrazelluläre Anhäufung von A β scheint zeitlich vor der extrazellulären Bildung von senilen Plaques zu stehen⁵². Dabei akkumulieren intrazelluläre A β -Oligomere im endoplasmatischen Retikulum, Lyso- und Endosomen sowie den Mitochondrien hippocampaler Neurone und induzieren über reaktive Freisetzung von Cathepsin D, Cytochrom C, und Caspase-3-Aktivierung den Zelltod in vivo⁵³. Das Vorkommen von APP und den Sekretasen in diversen intrazellulären Membranen, wie denen der Mitochondrien, des Golgi-Apparats oder anderer Zellorganellen legt eine intrazelluläre Produktion und möglicherweise Beteiligung an sekretorischen Prozesse nahe^{51, 54}. Auch hier ist die pathophysiologische Komponente strittig; Wegiel et al. finden intrazelluläres A β auch bei Kindern, Jugendlichen und im normalen Alterungsprozess und erklären damit das intrazelluläre A β zu einem Teil des normalen neuronalen Metabolismus⁵⁵.

Außerdem kann extrazelluläres A β unter Beteiligung verschiedener Rezeptoren in Zellen aufgenommen werden. Unter anderen nehmen assoziierte Proteine des low-density-lipoprotein (LDL)-Rezeptors, ApoE-Rezeptoren⁵⁶, und der nikotinische Acetylcholinrezeptor Alpha 7 (nAChR α 7) das extrazelluläre A β nach intrazellulär auf^{51, 52}. Dabei führt eine Bindung des A β an den nAChR α 7 in Neuronen paradoxerweise

zu einem neurotoxischen Effekt, obwohl andere Agonisten an diesem Rezeptor eher neuroprotektiv wirken^{51, 57}.

Auch Amyloidablagerungen in der Wand von Blutgefäßen (CAA) spielen eine pathogenetische Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung; 98% der AD-Patienten weisen diese auf. Hierbei lagert vor allem A β -40 in den Gefäßwänden ab, was dazu führt, dass Teile der Gefäßwand zerstört werden, sich der zerebrale Blutfluss verringert und die kognitive Beeinträchtigung zusätzlich verschlechtert⁸. Besonders bei der CAA-Bildung wird der pathophysiologische Beitrag von Blutplättchen diskutiert⁶.

Zusammenfassend scheint für das Ausmaß der durch A β verursachten Toxizität, seiner pathogenetischen oder aber auch physiologischen Rolle, die A β -Homöostase entscheidend zu sein. Reguliert wird diese über ApoE, die Fetttransporter ABCA1 und ABCG1, das dem LDL-Rezeptor verwandte Protein 1 und 2 (LRP-1, LRP-2) und P-Glykoprotein (P-GP)²⁶, die somit vielversprechende Ansatzpunkte für das bessere Verständnis der AD-Pathophysiologie darstellen.

Für die Diagnosestellung der AD wurde die A β - Messung im Liquor und peripheren Blut untersucht. Hier zeigte sich, dass hohe A β -Spiegel in kognitiv Gesunden Prädiktoren für eine Demenzzustand sind⁵⁸. Die A β - Spiegel sind bei Eintreten der Erkrankung niedriger, als im klinisch unauffälligen Zustand, was möglicherweise an der höheren Ablagerung und damit einhergehenden klinischen Symptomatik liegt (Abbildung 1)⁵⁸.

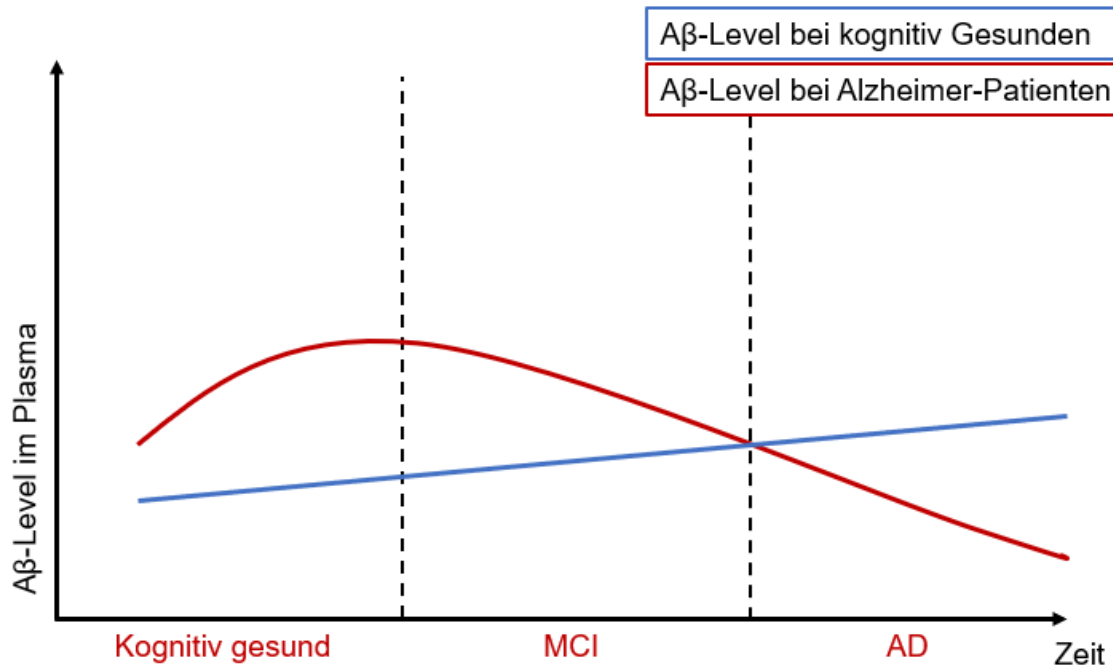


Abbildung 1 – Entwicklung der Aβ-Level im Plasma bei Fortschreiten der Alzheimer-Erkrankung (AD).

MCI, Mild Cognitive Impairment; AD, Alzheimer-Demenz; Aβ, Amyloid β.

Modellhafte Darstellung der Entwicklung des Aβ-Levels im Plasma von AD Patienten und gesunden Kontrollen über den Alterungsprozess. In kognitiv Gesunden scheint der Aβ-Spiegel über die Jahre anzusteigen, wohingegen er bei Patienten, die eine AD entwickeln, zunächst ansteigt, einen Höhepunkt erreicht und dann kurz vor Beginn der Entwicklung klinischer Demenzsymptome wieder abfällt, sodass bei manifester Demenz gesunde Kontrollen mehr Aβ im Plasma aufweisen, als AD-Patienten⁵⁸. Aus dem Englischen nach Song et al. 2011, Abbildung 4, S.15⁵⁸.

Verschiedene, in die Pathophysiologie der Erkrankung eingreifende Medikamente wurden in den letzten Jahren diskutiert, dennoch ohne durchschlagenden Erfolg⁵⁹. Vor allem Immuntherapien, die Aβ eliminieren, zeigten nicht den erhofften Effekt^{60, 61}, sodass die Vermutung nahe liegt, es müsse einen bisher unbekanntem Mechanismus, der in der AD-Entstehung chronologisch vor der Aβ-Akkumulation liegt, geben. Nach dieser Theorie könnte die Aβ-Akkumulation nur kompensatorisch auf dieses Event folgen⁶².

1.1.2.2 Tau-Fibrillen

Neben den A β -Läsionen im Gehirn der Alzheimer-Patienten spielt eine weitere Pathologie eine entscheidende Rolle: Innerhalb der Neuronen bilden sich durch Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins sogenannte neurofibrilläre Bündel (NFT).

Das Tau-Protein reguliert im Zytosol den axonalen Transport und ist an Mikrotubulusformation und -stabilisierung beteiligt. Tau transportiert Zellorganellen entlang der Mikrotubuli und bildet Axone aus⁶³. Ebenfalls interagiert es mit synaptischen Funktionen⁶⁴; auch in den Dendriten ist Tau präsent und scheint dort eine Rolle für die synaptische Plastizität zu spielen⁶⁵. In Studien mit Tau-deprivierten Mäusen zeigte sich außerdem, dass Tau auch für die neuronale Aktivität, die Genese neuer Neuronen und den Eisentransport relevant ist⁶⁶. Außerdem stabilisiert Tau die DNA in ihrer Z-Konformation, einer linksgängigen Doppelhelix, die vermutlich eine Rolle bei der Transkription spielt⁶⁷, und stabilisiert zudem zytoplasmatische und nukleäre RNA^{68, 69}.

Das Tau-Protein besteht aus drei Untereinheiten: dem N-Terminus, auch „projection domain“ genannt, dem mittleren, Prolin-reichen Teil, und dem C-Terminus, auch „Assembly domain“ genannt, weil dieser am Mikrotubuluaufbau beteiligt ist^{63, 66}. Es wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert und auch, aber weniger häufig, in Gliazellen⁷⁰. Zusätzlich kommt es auch extrazellulär vor, wo es sich zwischen Zellen hin und her bewegen kann⁷¹ und sich in seiner Struktur dynamisch veränderbar zeigt⁶³.

Die Läsionen A β und NFT spalteten lange die Wissenschaft in sogenannte (β -) „Baptisten“, die das A β als zentralen Akteur in der Pathogenese der AD sahen, und die „Tauisten“, die sich auf die NFTs konzentrierten⁷². Eine Verknüpfung beider Theorien gelingt über die Hypothese der Amyloid-Kaskade, in der die Bildung von A β -Plaques oder löslichen A β -Oligomeren die Phosphorylierung von Tau triggern und damit zur Bildung von NFTs führt. Dennoch ist der kausale Weg hinter dieser Hypothese nicht bekannt⁷³. Heute geht man von einer Kombination beider Läsionen aus⁷⁴. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Amyloid Ablagerungen im Gehirn nur dann mit einer kognitiven Beeinträchtigung einher gehen, wenn auch gleichzeitig NFTs vorhanden sind. Ohne diese NFTs führte auch dieselbe Menge an A β nicht zu Neuronenuntergang und Gedächtnisdefiziten⁷⁴⁻⁷⁶. Bei AD Patienten befindet sich achtmal mehr Tau-Protein im Gehirn als bei gesunden Kontrollen⁷⁷.

Nicht nur der dem A β nachgelagerte pathogenetische Effekt des Taus und der NFTs, sondern auch unabhängig von der A β -Kaskade gelegene Tau-Pathologien spielen eine pathogenetische Rolle bei AD⁶⁶. So sammelt sich hyperphosphoryliertes Tau gehäuft in Dendriten an und verursacht hier eine synaptische Dysfunktion^{65, 78}. Auch die Zerstörung des axonalen Transports und der Mikrotubulusformation durch Hyperphosphorylierung ruft einen von A β unabhängigen Schaden der Neurone hervor. Die Bildung von NFTs erfordert die Tau-Hyperphosphorylierung, aber auch weitere post-translationale Modifikationen, die bisher wenig untersucht sind^{76, 79}.

Auch das Protein selbst, ohne post-translationale Veränderungen, kann über seine Rolle in der Stabilisierung von Aktin und Myosin die Funktionalität von Mitochondrien beeinflussen und damit allein toxisch wirken⁸⁰⁻⁸².

Auch für das Tau wird eine prionenartige Wirkung wie bei A β vermutet und so der pathophysiologische Erklärungsansatz einer Tau-Aussaat über das periphere Blut oder andere Körperflüssigkeiten möglich^{32, 83}. Aber auch hier fehlen eindeutige Ergebnisse; die prionenartige Tau-Verbreitung bleibt kontrovers⁸⁴.

1.1.2.3 Cholinerge Hypothese

Das cholinerge System bezeichnet jene Strukturen, die Acetylcholin als Transmitter sowohl synthetisieren als auch freisetzen können. Die Cholinacetyltransferase (ChAT), das Acetylcholin (ACh), nikotinsche und muskarinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChR bzw. mAChR), die Fähigkeit, Cholin aufzunehmen und auch die Acetylcholinesterase (AChE) sind allesamt Komponenten⁸⁵. Eine besondere Rolle spielt das Acetylcholin im vegetativen Nervensystem. Sowohl im sympathischen als auch parasympathischen Teil des vegetativen Nervensystems wird der Übergang der Signale von präganglionär (2. Neuron) auf postganglionär (3. Neuron) über ACh vermittelt (über den nAChR). Der Übergang vom postganglionären Neuron auf die Effektoren im Parasympathikus werden ebenfalls cholinerg vermittelt (hauptsächlich mAChR), wohingegen im Sympathikus diese Übertragung adrenerg erfolgt². An der motorischen Endplatte werden Signale ebenfalls über ACh weitergegeben.

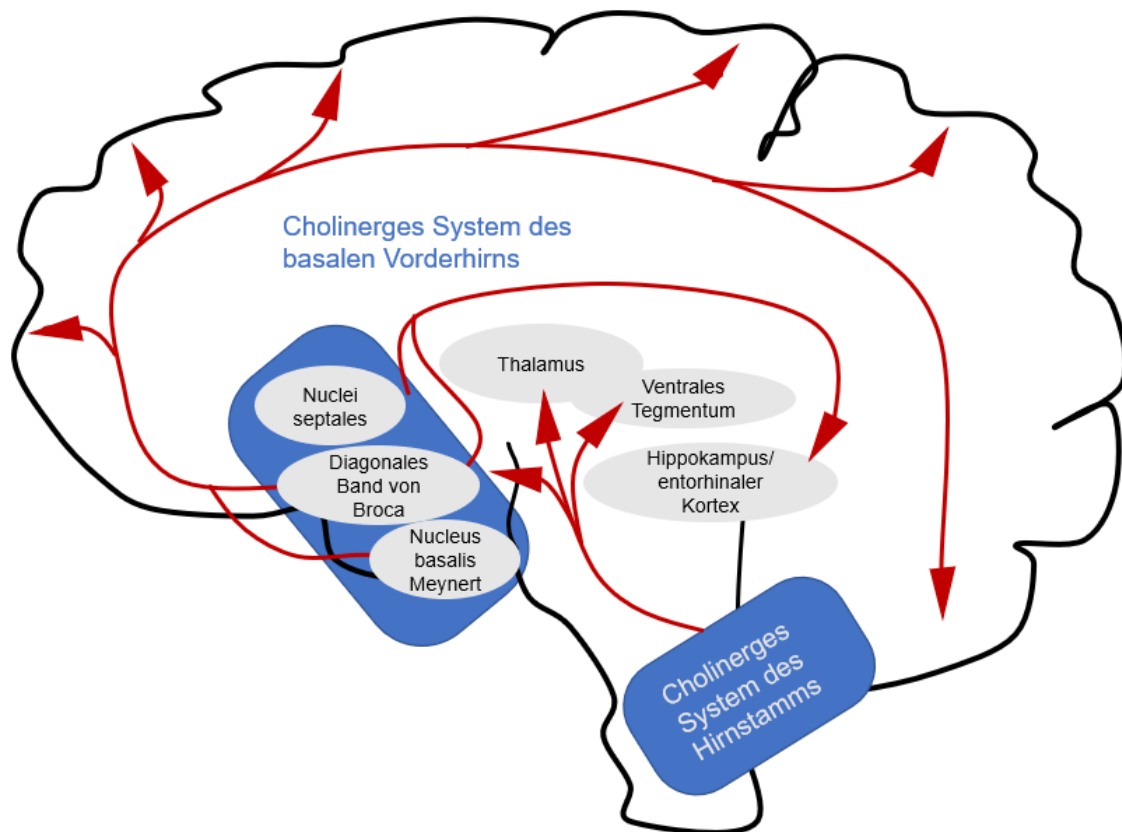


Abbildung 2 – Cholinerges System des basalen Vorderhirns.

Schematische Darstellung der Strukturen des magnozellularen cholinergen Systems des basalen Vorderhirns. Projektionen ziehen sowohl zum Neocortex als auch zur basolateralen Amygdala und dem Bulbus olfactorius, aber auch zum Hippocampus und entorhinalen Cortex. Das cholinerge System des Hirnstamms projiziert hauptsächlich zum Thalamus und ins basale Vorderhirn. Grafik in Anlehnung an: Newman et al. 2012, Abbildung 1, S.2 ⁸⁶

Auch im Gehirn gibt es Zentren cholinergischer Neurone, dabei spielt vor allem das basale Vorderhirn eine zentrale Rolle: Als basaler Teil des Telencephalon beinhaltet es die cholinergen Septumkerne, das diagonale Band von Broca als Teil des limbischen Systems, den Nucleus basalis Meynert (NBM), den Nucleus accumbens und das Tuberculum olfactorium. Diese Zentren projizieren in den gesamten Neocortex und Hippocampus und sind entscheidend für die Aufmerksamkeits- und Wachheitskontrolle (Abbildung 2) ⁸⁷.

In nicht-neuronalen Zellen konnte das cholinerge System ebenfalls identifiziert werden. Epitheliale, endotheliale- und Zellen des Immunsystems synthetisieren ACh, was an der Zellproliferation, -differenzierung und dem generellen Erhalt von Zellfunktionen beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der nikotinischen oder

muskarinischen Rezeptoren auf nicht-innervierten Zellen zu zellulärer Dysfunktion oder gar dem Zelltod führt⁸⁵.

In den 70er und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde erstmals die cholinerge Hypothese zur Alzheimer-Erkrankung eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass im Alter und insbesondere bei Demenzpatienten eine Degeneration des cholinergen Systems im Hirn stattgefunden hatte, die ebenfalls künstlich induziert werden konnte, wenn bei jüngeren Menschen anticholinerge Substanzen eingesetzt wurden⁸⁸. Wurde das cholinerge System hingegen bei älteren Patienten stimuliert, zeigten sich messbare Verbesserungen der kognitiven Leistung⁸⁸. Die cholinergen Neurone spielen eine maßgebliche Rolle für neuronale Plastizität⁸⁹. Ein Verlust cholinergischer Neurone hat eine Verschlechterung der Kognition zur Folge⁹⁰. Der Ncl. Basalis Meynert im basalen Vorderhirn konnte als der Ort cholinergischer Neurone identifiziert werden, die maßgeblichen Einfluss auf die Kognition haben und bei Alzheimer-Erkrankten degenerieren^{4, 91}. Seine Funktion für das Lernen bestimmt sich durch seine Rolle als Bindeglied zwischen dem limbischen System und dem Neokortex^{89, 92}. Zusätzlich sind bei AD das limbische (v.a. der Hippocampus) und paralimbische System betroffen. Diese Areale sind entscheidend für Gedächtnis und Aufmerksamkeit und degenerieren bei der Alzheimer-Erkrankung^{93, 94}.

Untersuchungen von Grothe et al. konnten zeigen, dass im Laufe des Lebens und Alterungsprozesses zwar generell das Volumen des cholinergen Systems im basalen Vorderhirn abnimmt, diese Abnahme bei manifester Alzheimer Erkrankung aber noch wesentlich stärker ist, als bei gleichaltrigen Gesunden. Dabei entstehen auch cholinerge Dysfunktionen im normalen Alterungsprozess, aber ein cholinergischer Zellverlust kommt nur bei AD vor^{95, 96}. Dabei entwickelt sich die Volumenabnahme von posterioreren Bereichen des Ncl. Basalis Meynert bei leichter AD, zu einer generalisierten und rostraleren Volumenabnahme des gesamten cholinergen Systems des basalen Vorderhirns⁹⁷.

Interessanterweise findet sich der Neuronenuntergang, der bei manifester AD festgestellt werden kann, noch nicht bei Patienten mit MCI oder frühen AD-Formen, trotzdem zeigt sich bei diesen Patienten ein Verlust der durch das cholinerge System vermittelten Funktionen. Als Ursachen werden Veränderungen der Akteure des cholinergen Systems wie der Cholinaufnahme und der Acetylcholinfreisetzung, sowie Veränderungen der Rezeptoren diskutiert (Abbildung 3)⁹⁸. All das deutet darauf hin,

dass das cholinerge System eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Erkrankung einnimmt⁹⁸.

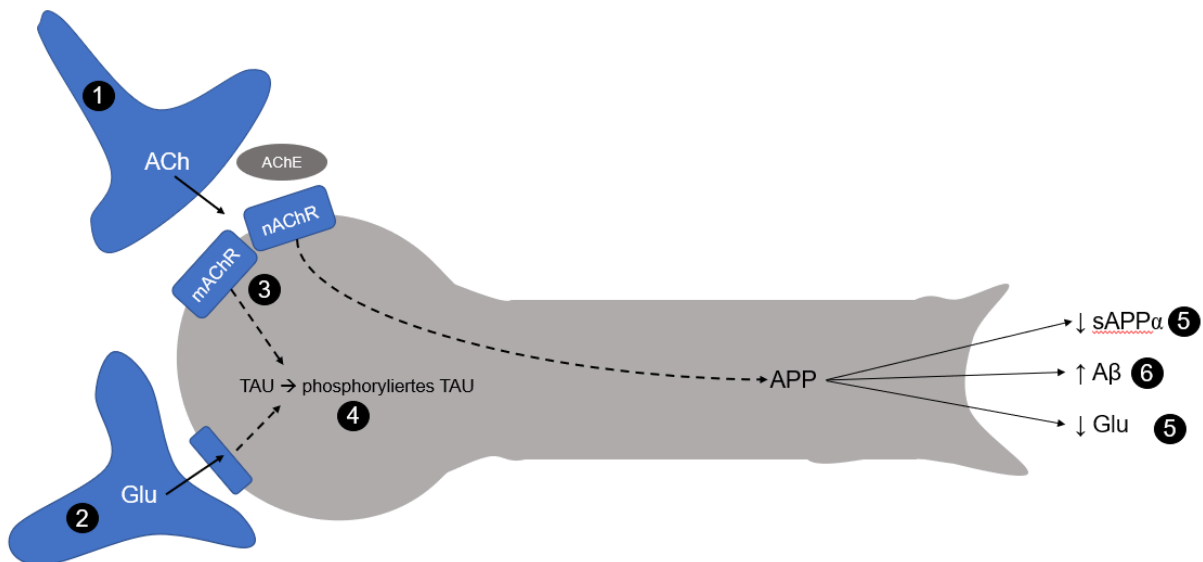


Abbildung 3 – neuronale Veränderungen bei AD⁹⁹.

[1] Verminderte cholinerge Innervation; [2] Verminderte kortikokortikale glutamaterge Neurotransmission durch Verlust von Synapsen oder Neuronen; [3] Verminderte Aktivierung der muskarinischen M1- Rezeptoren zum Second-messenger System; [4] Hyperphosphorylierung von Tau-Vorläufern zu NFTs; [5] Verminderte Sekretion von löslichem APP; [6] Erhöhte Aβ-Produktion; [7] Verminderte Glutamatproduktion. Grafik in Anlehnung an: Francis et al. 1999, Abbildung A, S.138⁹⁹

Ein umfassender Erklärungsansatz, wie ausgeprägt das cholinerge System bei AD beeinträchtigt ist, wie die pathophysiologisch relevanten Veränderungen interagieren und welche neurotransmitterunabhängigen Effekte Cholinesterasen haben, ist noch heute offen⁴. Der Schweregrad der Demenz ist zwar positiv korreliert mit dem Ausmaß der cholinergen Verarmung¹⁰⁰, dennoch haben Acetylcholinesterase-Inhibitoren, die die Neurotransmitterlast im synaptischen Spalt erhöhen sollen, keinen durchschlagenden Erfolg, sie wirken auch nur moderat symptomverbessernd⁴.

Mesulam et al. stellten einen Zusammenhang zwischen den bisher dargestellten AD-Pathologien Aβ und NFTs mit dem cholinergen System her; sie vermuten, dass die cholinerge Verarmung zum einen zu einer erhöhten Amyloid-Produktion und Hyperphosphorylierung von Tau führt¹⁰¹. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich in einer Studie

mit Parkinsonpatienten, die unter anticholinergem Therapie eine höhere neuronale A β und NFT-Dichte aufwiesen¹⁰². Außerdem scheint aber auch die Toxizität des A β im cholinergen Mangelzustand erhöht zu sein und Agonisten am nAChR wirken protektiv den Effekten der A β -induzierte Neurotoxizität entgegen¹⁰³. Auch hemmt A β die ACh-Synthese und die cholinerge Signaltransduktion^{104, 105}, wodurch ein Circulus vitiosus in Richtung einer Verstärkung der Pathologie und cholinergen Depletion entsteht¹⁰⁶. In histopathologischen post-mortem Untersuchungen von klinisch gesunden, älteren Patienten konnte außerdem gezeigt werden, dass eine verminderte Aktivität der Cholinacetyltransferase (CHAT) in den superioren frontalen Gyri und den superioren temporalen Gyri mit einer dort erhöhten A β -Konzentration korreliert¹⁰⁷. Die CHAT katalysiert den letzten Schritt der ACh-Synthese: ATP- getriggert wird die Übertragung einer Acetyl-Gruppe des Coenzym Acetyl-CoA auf Cholin katalysiert. In einer anderen Studie, die die Korrelation von CHAT- Aktivität und Amyloidplaques bei gesunden sowie AD-Patienten post-mortem untersuchte, zeigte sich ebenfalls eine verminderte CHAT- Aktivität in Proben mit Amyloidplaques. Dieser Effekt war noch verstärkt bei tatsächlich mit AD diagnostizierten Patienten zu beobachten¹⁰⁸. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Integrität des cholinergen Systems schon lange vor Einsetzen kognitiver Beschwerden beeinträchtigt ist (Abbildung 3). Zusätzlich konnte eine Interaktion des A β mit dem nAChR gezeigt werden^{93, 109}, auf die Rolle des nAChR in der AD soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

1.1.2.4 Nikotinischer Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$

Von ACh lassen sich zwei Rezeptortypen aktivieren: der ionotrope, nikotinische (nAChR) und der metabotrope muskarinische Acetylcholinrezeptor (mAChR). Der nAChR ist ein ligandengesteuerter Kationenkanal, der mAChR vermittelt G-Protein gekoppelt die Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Im ZNS sind sowohl nAChR als auch mAChR maßgeblich an wichtigen Hirnfunktionen wie Lernen und Aufmerksamkeit, aber auch dem Wachstum beteiligt.

Bei AD scheinen beide Rezeptortypen verändert. Obwohl beide bei AD verändert sind¹⁰⁹, zeigen sich bestimmte Zusammenhänge nur für den nAChR. So korrelierten die präsynaptisch verringerte CHAT Aktivität von AD-Patienten mit einer Verringerung der nAChR, nicht jedoch der mAChR¹¹⁰. Durch Studien mit Rauchern konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Nichtrauchern ein verringertes Risiko hatten,

neurodegenerative Erkrankungen zu erleiden¹¹¹, was den nAChR in den Fokus der AD-Forschung rückte. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Relevanz des nAChR.

Der nAChR ist ein Kationenkanal (Na⁺, K⁺, Ca²⁺- Ionen), der durch Acetylcholin (ACh) und Nikotin aktiviert wird. Je nach Zusammenstellung verschiedener α - und β -Untereinheiten ergeben sich zahlreiche Subtypen des Rezeptors mit ebenso zahlreichen Eigenschaften^{112, 113}. Von den nAChR sind hauptsächlich der heteropentamere $\alpha 4\beta 2$ und der homopentamere $\alpha 7$ im ZNS vertreten. Der nAChR $\alpha 4\beta 2$ hat eine hohe Affinität für Nikotin und Cytosin, wohingegen der nAChR $\alpha 7$ eine hohe Affinität zu α -Bungarotoxin (α -BTX) und weniger zu Nikotin und Cytosin aufweist⁵².

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist der homopentamere nAChR $\alpha 7$, der auch auf Thrombozyten identifiziert werden konnte¹¹⁴. Die homopentameren Acetylcholinrezeptoren besitzen eine wesentlich höhere Permeabilität für Calcium²⁺ als die heteropentameren Acetylcholinrezeptoren und spielen damit eine entscheidende Rolle für neuronale Signaltransduktion und Plastizität¹¹². Die nAChR $\alpha 7$ kommen im ZNS in neuronalen Zellen, vor allem in Zellen des Hippocampus, aber auch des Kortex vor, die wichtig für Kognition, Gedächtnis und Aufmerksamkeit sind, aber auch in nicht-neuronalen Zellen wie Mikroglia, Oligodendrozyten, Endothelzellen und Astroglia^{111, 115, 116}. Interessanterweise gibt es Evidenz sowohl für neuroprotektive als auch neurodegenerative Effekte einer Aktivierung des nAChR $\alpha 7$.

Studien konnten zeigen, dass die Dichte des nAChR $\alpha 7$ im frühen embryonalen Stadium und im Erwachsenenalter besonders hoch ist, was darauf hindeutet, dass der Rezeptor eine entscheidende Rolle für das Wachstum, aber auch das Altern haben könnte⁵². Bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen ist die Rezeptordichte außerdem signifikant erniedrigt⁵². Der Hippocampus und das gesamte limbische System sind besonders vom Neuronenuntergang bei AD betroffen. In diesen Hirnregionen zeigt sich auch eine besonders hohe Dichte an nAChR⁹³. Ebenfalls geht diese hohe Dichte mit einer frühen Ablagerung von A β im basalen Vorderhirn einher⁹³. Bei AD gehen also besonders die nAChR $\alpha 7$ -reichen Zellen unter.

Zudem interagiert A β mit und bindet mit hoher Affinität an den nAChR $\alpha 7$ ^{52, 93, 117}. Die Interaktion erfolgt an der Agonist-bindenden Seite des Rezeptors. Nach Aktivierung des nAChR $\alpha 7$ werden molekulare Signalwege in Gang gesetzt, die mit synaptischer Plastizität, Neuroprotektion, Lernen und Gedächtnis assoziiert sind^{109, 118}. Es wird

vermutet, dass sich die intrazelluläre Signaltransduktion von der anderer Agonisten wie z.B. Nikotin unterscheidet. Hierbei spielen Signalwege eine Rolle, die den Zelltod und die Sekretion von A β kontrollieren⁵⁷. In experimentellen Studien zeigte sich der Effekt der Interaktion von A β mit dem nAChR konzentrationsabhängig; niedrige Konzentrationen wiesen eine rezeptoraktivierende Funktion auf, hohe Konzentrationen hingegen hatten einen rezeptorinhibierenden Effekt⁹³.

Auch die Expositionszeit scheint eine Rolle zu spielen; so scheint eine kurze Inkubationszeit von A β mit dem Rezeptor und eine niedrige A β -Konzentration eher eine Aktivierung zu begünstigen, wohingegen längere Expositionszeit eher eine Inhibition begünstigen⁹³. Eine Studie von Arora et al. zeigte, dass eine längere Exposition mit nanomolaren A β -Konzentrationen und nachfolgende Aktivierung des nAChR $\alpha 2\beta 4$ mit Nikotin eine Rezeptoraktivierung hervorrief, die zu einer Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase führte und damit eine mitochondriale Fehlfunktion und oxidativen Stress erhöhte¹¹⁹. Besonders der nAChR $\alpha 7$ reagierte auf pikomolare Konzentrationen von A β , während heteropentamere nAChR erst bei nanomolaren Konzentrationen reagierten¹²⁰. Je nach Konzentration und Expositionszeit mit A β und auch der Rezeptorart (homopentamer vs. heteropentamer) unterscheiden sich also die physiologischen Effekte auf den Rezeptor in exzitatorisch und inhibitorisch¹⁰⁹. Bei Aktivierung des Rezeptors werden anti-apoptotische Mechanismen verstärkt und die Aktivierung mit Nikotin weist über diesen Weg neuroprotektive Effekte auf¹²¹. Damit könnte die Bindung von A β an den nAChR $\alpha 7$ ein Schlüsselereignis in der Genese der AD sein und dadurch das cholinerge Signaldefizit in der AD hervorrufen^{93, 122, 123}. Dennoch sind die Ergebnisse in der Literatur uneinheitlich.

1.1.3 Therapieansätze

Nach der aktuellsten deutschen Leitlinie zur Alzheimer-Demenz besteht die Therapie der AD aus zwei Säulen: Der Behandlung der Demenz selbst und den oft mit der Demenz einhergehenden psychischen Symptomen wie z.B. Depressionen, Wahn oder Apathie¹²⁴. Es lassen sich folgende, evidenzbasierte Therapieoptionen unterscheiden¹²⁴:

- Acetylcholinesterase- Hemmer (AChE-I) (für die leichte- bis mittelschwere AD)
- Der nicht kompetitive NMDA-Antagonist Memantin (für die moderate- bis schwere AD)

- Ginkgo Biloba
- Lebensstilveränderungen

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf den AChE-I. AChE-I dienen in erster Linie zur Verbesserung der Alltagskompetenz und Kognition¹²⁴. Zu den eingesetzten Medikamenten, die die Demenz verbessern sollen, gehören die Acetylcholin-Esterase Hemmer Donepezil (Aricept®, Pfizer), Rivastigmin (Exelon®, Novartis) und Galantamin (Reminyl®, Janssen-Cilag), wobei jeweils die verträglichste Dosis angestrebt werden soll¹²⁴. Eine Überlegenheit einer Substanz gegenüber den zwei jeweils anderen ist nicht bekannt, weswegen eine individuelle Abwägung anhand des Neben- und Wechselwirkungsprofils empfohlen wird¹²⁴. Durch die Erhöhung der ACh-Konzentration im synaptischen Spalt kann die kognitive Leistung verbessert werden¹²⁵, sobald aber viele cholinerge Neurone untergegangen sind, ist dieser Effekt obsolet⁴.

Auch wenn die S3-Leitlinie zur Alzheimer-Therapie den AChE-I eine rein symptomatische Wirkung zuschreibt, da die Studienlage sehr kontrovers ist, konnten in den letzten Jahren viele weitere Funktionen der AChE-I untersucht werden. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass anticholinerge Medikamente nicht nur symptomatisch, sondern auch weitere, die Krankheit beeinflussende Wirkungen aufweisen, wenn sie frühzeitig in der AD eingesetzt werden⁴. So scheint z.B. die Gabe von Donepezil einen Einfluss auf die Dicke und Morphologie der Großhirnrinde von AD-Patienten zu haben¹²⁶. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass AChE-I auch den A β -Metabolismus verändern und die Ablagerung von A β möglicherweise reduzieren, was Anhalt für ein größeres Wirkspektrum gibt¹²⁷. Deshalb wird diskutiert, ob AChE-I geeigneter in der Prävention der AD einsetzbar wären¹⁰⁸: Durch einen kognitiven Stresstest könnten dann zukünftige Patienten schon vor der klinischen Diagnose des MCI detektiert und frühzeitig mit AChE-I behandelt werden, um damit den sukzessiven Neuronenuntergang zu verhindern⁴. Auch Sarno et al. konnten zeigen, dass eine sechsmonatige Therapie mit dem AChE-I Donepezil die BACE herunterreguliert. Damit legen sie nahe, dass dieser AChE-I nicht nur symptomverbessernd, sondern auch den Krankheitsverlauf beeinflussend wirkt¹²⁸.

AChE-I können auch über die ACh-Erhöhung hinaus fördernd bei AD wirken¹²⁷. Die Acetylcholinesterase hat auch nichtkatalytische Funktionen, die für die AD-Pathophysiologie relevant sein können. Ihre nichtkatalytischen Funktionen sind möglicherweise relevant für Apoptose, Zelladhäsion, A β -Aggregation¹²⁹ und

Neuritenwachstum^{130, 131}. Die AChE kann mit A β komplexieren¹²⁹. AChEs haben eine katalytische und eine periphere Bindungsstelle; die periphere Bindungsstelle interagiert mit A β und sorgt für eine Veränderung des A β hin zu unlöslichen A β -Fibrillen. Weiterhin hemmen AChEs die APP-spaltenden Sekretasen β und γ und haben einen Einfluss auf intrazelluläre APP-Level, post-transkriptional und transkriptional¹³⁰.

1.2 Thrombozyten und die Alzheimer-Erkrankung

1.2.1 Thrombozyten als neuronales Modell

Thrombozyten sind die kleinsten Zellen des Blutes und entstehen durch Abspaltung von Megakaryozyten aus dem Knochenmark. Sie besitzen keinen Kern, aber freie RNA, Mitochondrien und zahlreiche Speichergranula, die verschiedenste Proteine für die Funktion der Thrombozyten beinhalten. Neben den Erythrozyten sind sie die am häufigsten vorkommenden Zellen im peripheren Blut. Thrombozyten sind entscheidende Akteure von Hämostase und Thrombose. Die physiologische Bedeutung der Thrombozyten ist allerdings bei Weitem nicht auf diese Funktion begrenzt. Durch ihre zahlreichen pro-inflammatorischen Mediatoren und die direkte Interaktion mit T-Zellen können sie als Teil des angeborenen Immunsystems angesehen werden^{132, 133}. Zusätzlich tragen sie zahlreiche Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die auch in neuronalen Prozessen eine elementare Rolle spielen. Ebenfalls ähneln sich die entsprechenden Wege der Signaltransduktion, der Akkumulation und der Freisetzung von Neurotransmittern und auch die Signalantwort auf veränderte Calciumkonzentrationen, weshalb der Thrombozyt als Modell für Neuronen eingesetzt wird¹³⁴. Zu Beginn konzentrierte sich die Forschung auf das Vorkommen von serotonergen Rezeptoren¹³⁵, mittlerweile wurden zahlreiche weitere Neurotransmitter und neuronal vorkommende Rezeptoren auf Thrombozyten identifiziert. Auch die biogenen Amine Epinephrin, Dopamin und Histamin sind in Plättchen gespeichert und können von ihnen freigesetzt werden^{132, 134, 136, 137}. Auch GABA kommt vor, jedoch in geringerer Konzentration als die biogenen Amine¹³⁸.

Bei vielen psychiatrischen und neurodegenerativen Krankheiten wurden ähnliche pathologische Veränderungen sowohl in Neuronen als auch in Plättchen festgestellt, unter anderem bei der AD, aber auch bei der Depression und Schizophrenie¹³⁹. Die Sekretion der Neurotransmitter aus Thrombozyten erfolgt ähnlich der Sekretion in

Neuronen mithilfe spezieller Moleküle wie z.B. SNAREs, VAMPs und Syntaxinen^{132, 137}. Auch ein Adhäsionsmolekül, was stark dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) ähnelt, ist in Plättchen und T-Zellen vorhanden. Es reguliert neuronal die Stabilisierung von Synapsen und damit auch die Langzeitpotenzierung^{132, 140}. Die zahlreichen thrombozytären Veränderungen, die bei der AD vorkommen, machen Plättchen attraktiv für die Diagnostik, aber auch für ein tieferes Verständnis der AD-Pathophysiologie und mögliche Therapieansätze.

1.2.2 Akteure der Alzheimer-Pathophysiologie in Thrombozyten

Als Hauptakteure in Hämostase und Thrombose beeinflussen Thrombozyten die vaskuläre Integrität, gleichzeitig sprechen viele wissenschaftliche Erkenntnisse für die Relevanz vaskulärer Beeinträchtigungen in der AD-Pathologie¹⁴¹. Thrombozyten spielen eine elementare Rolle für vaskuläre Veränderungen und Atherosklerose, nicht nur im späteren Verlauf der Atherosklerose, wie lange angenommen, sondern möglicherweise schon ganz zu Beginn¹⁴², was zusätzlich die Wichtigkeit der Thrombozyten in Verbindung mit zerebrovaskulären Ablagerungen und der AD hervorhebt. Vor allem für den Verlauf der AD scheinen zerebrovaskuläre Degeneration und darauffolgend zerebrovaskuläre Minderperfusion eine Rolle zu spielen^{143, 144}. Untersuchungen zeigen zudem, dass vaskuläre Risikofaktoren wie erhöhtes LDL-Cholesterin und ein Diabetes mellitus mit einer schnelleren kognitiven Verschlechterung bei AD assoziiert sind¹⁴⁵.

Auch die Verbindung zu vaskulären Demenzen liegt nahe: Untersuchungen konnten zeigen, dass beide Krankheitsbilder sich überlappen; auch AD-Patienten weisen ähnliche Pathologien wie bei vaskulären Demenzen, zum Beispiel eine deutliche Veränderung des zerebralen Blutflusses, auf⁹. Es ist strittig, ob bei der vaskulären Demenz überhaupt von einer eigenen Entität ausgegangen werden kann¹⁴⁶.

Neben den vaskulären Veränderungen spielen auch andere thrombozytäre Alterationen eine Rolle in der AD. So sind die beiden Hauptakteure, APP und A β , nicht nur neuronal, sondern auch im peripheren Blut nachweisbar und haben einen speziellen Einfluss auf Blutplättchen gezeigt¹⁴⁷. Thrombozyten enthalten das APP und alle relevanten Enzyme, um A β daraus abzuspalten (Tabelle 1)^{147, 148}. Thrombozyten gelten sogar als die Hauptquelle für APP bzw. A β im peripheren Blut¹⁴⁹. So werden A β oder APP-Fragmente nicht nur aus membranständigem APP geschnitten, sondern

sind auch in den α -Granula enthalten und wurden entweder von extern in diese aufgenommen, oder schon in den Vorläufern der Thrombozyten, den Megakaryozyten, produziert¹⁵⁰⁻¹⁵². Dabei unterscheiden sich die APP-Isoformen bei AD-Patienten signifikant von denen gesunder Patienten^{38, 153}. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass A β sowohl in aktiven, als auch seneszenten Plättchen vorkommt¹⁵⁴ und durch ihre Aktivierung freigesetzt wird^{155, 156}.

Die physiologische Rolle des A β bzw. des APP in den Thrombozyten ist noch unklar, Vermutungen legen nahe, dass das APP als Rezeptor fungiert und die Calcium-Mobilisation beeinflusst^{157, 158}. A β ist mithilfe von ADP in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren. Dies kann möglicherweise auch allein durch A β erfolgen, jedoch nur, wenn Thrombozyten lange mit A β exponiert sind¹⁴⁷. Durch A β -Stimulation bilden Plättchen Mikropartikel, ähnlich den Mikropartikeln, die durch Aktivierung mit Thrombin entstehen¹⁴⁷, was die Theorie der erhöhten Aktivierung unterstützt. Weiterhin zeigte sich, dass Thrombozyten in der Lage sind, lösliches zu fibrillärem A β zu prozessieren¹⁴⁷. Es sind zwar andere Isoformen des A β im Gehirn als in Plättchen zu finden, allerdings kann lösliches A β von Plättchen modifiziert werden, was dann zu einer zeit- und dosisabhängigen Erhöhung des A β 42 in den extrazellulären Plaques im Gehirn führt¹⁴⁷. Die prionenartigen Eigenschaften des A β , besonders der kleinen, löslichen Form, legt nahe, auch peripher, möglicherweise in Thrombozyten, nach solchen löslichen Amyloid-Samen zu suchen, die in der Pathogenese die Bildung von Amyloid im Gehirn maßgeblich zu beeinflussen vermögen³².

Eine weitere Hypothese diskutiert die Plättchenaktivierung und -adhäsion an Gefäßwänden als den ersten Schritt in der Entwicklung der zerebralen Amyloidangiopathie, da sie am Initiationsprozess der Gerinnung nach Gefäßverletzungen beteiligt sind und maßgeblich zur Produktion des A β beitragen⁸. Interessanterweise lagert sich A β hauptsächlich in Regionen um die intrakraniellen Gefäße ab und legt damit einen Zusammenhang zwischen A β aus dem Blut und dem Gehirn nahe¹⁵⁹. Möglicherweise reichert sich lösliches A β im Extrazellularraum der glatten Muskulatur der Gehirngefäße in Form der CAA an und zerstört diese dadurch³⁸. Das wird weiter bestärkt durch die Studie von Sutcliffe et al., die kürzlich zeigte, dass eine Reduktion von peripherem A β auch die A β -Last im Gehirn vermindern kann^{143, 160}. In vielerlei Hinsicht gelten Thrombozyten daher als Bindeglied zwischen peripheren Entzündungsreaktionen und A β -Fibrillenbildung und Ablagerungen^{156, 161}.

Die Anhäufung des A β in den Thrombozyten ist auch durch die unterschiedlichen Aktivitätslevel der APP-spaltenden Sekretasen zu begründen³⁸. Die beta- und gamma-Sekretase waren in Untersuchungen hochreguliert, alpha-Sekretasen hingegen herunterreguliert^{162, 163}. Diese Veränderungen in der Enzymexpression sind in Thrombozyten ähnlich zu den Veränderungen im ZNS.

Auch die Elemente der Tau-Hypothese wie die Tau-Fibrillen und die Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3 β), die mit der Phosphorylierung des Tau-Proteins assoziiert ist, finden sich in Thrombozyten und weisen eine Veränderung bei Alzheimer-Patienten auf¹⁶⁴. Die GSK3 β ist überaktiv bei AD-Patienten, wodurch es zu einer Hyperphosphorylierung des Tau und damit einhergehend eingeschränkter Funktion und fehlerhafter Zusammensetzung der Mikrotubuli kommt, die sich dann als neurofibrilläre Bündel ablagern³⁸. Weiterhin begünstigt die Aktivierung von GSK3 β die Produktion von amyloidogener APP-Prozessierung³⁸. Die GSK3 β ist in Thrombozyten im Vergleich zu anderen Zellen des peripheren Blutes vermehrt exprimiert und möglicherweise an der Plättchenaktivierung beteiligt³⁸.

Die kausale Einbettung der Thrombozyten in die AD-Pathophysiologie bleibt dennoch bisher weitgehend unklar¹⁶⁵. Zwar liegen Theorien über pathophysiologische Verbindungen vor (siehe Catricala et al.¹⁵⁴, Humpel et al.⁶), und einige thrombozytäre Biomarker für die AD-Diagnostik werden diskutiert¹⁶⁵, dennoch eröffnet die Literatur vielseitige Theorien und oft widersprüchliche Ergebnisse.

1.2.3 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ auf Thrombozyten

Rezeptor in der Peripherie

Nicht nur im ZNS, sondern auch auf Zellen des peripheren Blutes, unter anderem den Thrombozyten, konnte der nAChR $\alpha 7$ nachgewiesen werden¹¹⁴. Als funktioneller Kalziumkanal ist er an der Aggregation und Fibrinogenrezeptoraktivierung beteiligt^{114, 166}. Seine Aktivierung über Acetylcholin führt zu einer Signalkaskade, durch die die intrazelluläre Calciumkonzentration zunimmt. Die Calciumkonzentration wiederum reguliert Aggregation und Degranulation der Thrombozyten. Der nAChR $\alpha 7$ gilt zwar als ligandengesteuerter Ionenkanal, dennoch deuten weitere Erkenntnisse darauf hin, dass dieser Rezeptor in nicht-neuronalen Immunzellen auch metabotrope Signalwege aktivieren kann. So zeigten King et al. kürzlich, dass eine Untereinheit des Rezeptors an ein G-Protein koppeln kann und damit über intrazelluläre Calciumerhöhung

Signalwege in Gang setzt, die länger persistieren, als es eine alleinige Öffnung des Kanals hervorrufen würde¹⁶⁷. Bei Aktivierung der Thrombozyten wird ACh freigesetzt, was die Aktivierung verstärkt¹¹⁴. Die Signalkaskade, die nach Aktivierung des Rezeptors beginnt, ist für eine normale Plättchenreaktivität notwendig und schwächt Entzündungsreaktionen ab¹⁶⁸. Auf Plättchen sorgt der Mangel an nAChR $\alpha 7$ in Studien mit Mäusen für eine erhöhte Expression von $\alpha 2\beta 3$ - Integrin nach ADP-Stimulation und damit erhöhte Aktivierung. In Gegenwart von Agonisten des nAChR hingegen zeigt sich eine erniedrigte Aggregation¹⁶⁸.

1.2.4 Thrombozytäre Veränderungen bei AD

Historisch fielen sich schon früh Veränderungen der Thrombozyten bei vorliegender Alzheimer-Erkrankung auf. Zuerst konnten Veränderungen in der Membranfluidität der Thrombozyten^{39, 169} und Ligandenbindungsfähigkeit an $\alpha 2$ -Adrenorezeptoren festgestellt werden. Weiterhin zeigte sich eine verminderte Aktivität der Cytochrom-C Oxidase und Phospholipase C, sowie eine erhöhte Aktivität der Monoamino-Oxidase. Darüber hinaus konnten auch Veränderungen in den Botenstoffkonzentrationen von Serotonin gemessen werden (für eine Zusammenfassung siehe Tabelle 2)¹⁷⁰.

Tabelle 2 – Veränderungen in Thrombozyten bei Alzheimer-Erkrankung

Name	Veränderung	Quelle
Membranfluidität	Erhöht	169, 171
Alpha-2 Adrenorezeptor-Bindung	Erhöht	172
Cytochorm-C Oxidase	Erniedrigt	173
Protein Kinase C Aktivität	Erhöht	174
Phospholipase C Aktivität	Erniedrigt	175
APP und A β	Vorhanden, veränderte Prozessierung	35, 176
Thrombozytäres Serotonin Level	Erniedrigt	177
Plasmatisches Serotonin Level	Erhöht	178

1.2.5 Einfluss anticholinergere Medikamente auf Thrombozyten

Die Rolle des nAChR in der Thrombozytenaktivierung und Bedeutung des peripheren cholinergen Systems in der AD-Pathophysiologie lässt einen Einfluss der anticholinergen Therapie mit AChE-I auf die thrombozytäre Funktionsweise vermuten. Smith et al.¹⁷⁹ kamen durch ihre Untersuchung zu dem Schluss, dass die Blockade der AChE in Plättchen keinen Einfluss auf die Plättchenfunktion habe. In neueren Studien zeigen sich allerdings Einflüsse des thrombozytären cholinergen Systems auf die Plättchenfunktion.

In einer Studie von Borroni et al.¹⁵³ zeigten sich messbar veränderte APP-Formen bzw. -Ratios unter AChE-I Therapie, was eine veränderte Prozessierung und einen veränderten Transport des APPs in peripheren Zellen nahelegt. Auch unter sechsmonatiger Therapie mit dem AChE-I Donepezil konnte eine Herunterregulierung der thrombozytären BACE festgestellt werden¹²⁸. Interessanterweise kann Donepezil eine Blutungsneigung hervorrufen und ACh scheint mit seinem Einfluss auf Thrombozyten ein endogener Hemmstoff der Thrombozytenaktivierung zu sein. Daher wird das cholinerge System als ein neues Ziel für antithrombotische Therapien in Betracht gezogen¹⁸⁰. Weiterhin zeigt sich in Plättchen nach sechsmonatiger AChE-I Therapie mit Donepezil eine erhöhte Phosphorylierung der GSK3 β , was zu Inaktivierung des Enzyms führt. Die GSK3 β ist an der Phosphorylierung von Tau, der Vorstufe der NFTs beteiligt, somit wird durch seine Hemmung die Last an phosphoryliertem Tau-Protein reduziert¹⁸¹. Eine erhöhte Aktivität der Phospholipase A2 (PLA2) in Plättchen könnte eine verringerte A β -Produktion zur Folge haben¹⁸¹.

1.2.6 Thrombozytäre Biomarker für die Alzheimer-Diagnose

Da zahlreiche Veränderungen bei AD in den Thrombozyten auftreten, wurden einige thrombozytenspezifische Parameter als potenzielle Biomarker für die AD-Diagnose evaluiert. Akingbade et al.¹⁶⁵ stellten alle erfolgversprechenden Parameter kürzlich in einer Übersichtsarbeit dar und inkludierten alle Studien, die vom 01.01.1987 bis 25.01.2018 publiziert wurden. Dabei spielten vor allem die Oberflächenrezeptoren APP, die APP-spaltenden Enzyme β - und γ -Sekretase (BACE1 und ADAM10), das Tau-Protein, α -Synuclein, Serotonin, Cholesterin, Phospholipasen, die MAO-B und behüllte Plättchen eine Rolle. Die Akteure, die auch in der AD-Pathologie eine direkte Rolle spielen, scheinen die aussichtsreichsten Marker zu sein, darunter sind Tau aus

Plättchen, die APP und die APP-spaltenden Sekretasen, da die Veränderungen hier über verschiedene klinische Stadien bestehen¹⁶⁵. Neben den Proteinen scheinen aber auch Veränderungen plättchencharakterisierender Variablen wie das mittlere Plättchenvolumen und die Membranfluidität eine Rolle für Diagnose und Prognose zu spielen¹⁶⁵. Auch die charakteristischen Proteine Tau und A β , die ebenfalls in Thrombozyten vorkommen, konnten bereits im peripheren Blut gemessen werden und werden als Biomarker der AD-Diagnose diskutiert (Tabelle 3)^{66, 182, 183}.

Tabelle 3 – Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse aus dem Review von Akingbade et al.¹⁶⁵ zu thrombozytären Biomarkern in der Alzheimer-Diagnostik.

Plättchen-basierter Biomarker	Veränderung und Funktion	Probleme und Erklärungen
Mittleres Plättchen-volumen (MPV)	<ul style="list-style-type: none"> - Assoziation des MPV mit dem MMSE - MPV bei AD < MPV bei MCI < MPV bei Kontrollen - Höheres MPV als Indikator für die kognitive Funktionsfähigkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - Pathophysiologie unklar, evtl. Marker pro-inflammatorischer Veränderungen, Synapsenverlust, Amyloid- und NFT-Bildung, möglicherweise eher Indikator für Krankheitsprogression - Keine standardisierte Messmethode, Studienlage kontrovers - Gleiche Veränderungen bei vaskulärer Demenz - Veränderungen zwischen Geschlechtern, Ethnie, im normalen Alterungsprozess, mit Komorbiditäten und unter Medikation nicht untersucht
Behüllte Plättchen	<ul style="list-style-type: none"> - Plättchen, die durch Doppelstimulation von Thrombin und Kollagen so verändert sind, dass pro-koagulatorisches APP auf der Oberfläche exprimiert wird - Mehr behüllte Plättchen in frühen AD Stadien als bei gesunden Kontrollen, verringert in späteren Stadien - Nur bei AD, nicht bei anderen Demenzformen 	<ul style="list-style-type: none"> - Erhöht bei frühen AD-Formen: Amnestische MCI → Biomarker für frühe Diagnose und Krankheitsprogression

<p>Tau-Protein</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GSK3β erhöht in frühen AD-Phasen (amnestisches MCI), aber keine Veränderungen der GSK3β-Level im AD Verlauf - Tau-Protein korreliert mit Hirnatrophie und Ausmaß der kognitiven Einschränkung 	<ul style="list-style-type: none"> - Dünne und kontroverse Studienlage
<p>APP</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Reduzierte α-Sekretase in AD-Plättchen - Reduziertes Verhältnis von großen (120-130kDa) zu kleinen (110kDa) APP-Fragmenten - Keine Aβ-Erhöhung in Plättchen bei AD - Eine Studie fand negative Korrelation des MMSE mit der APP-Menge 	<ul style="list-style-type: none"> - Kontroverse Studienlage - Auch Altern ruft Veränderungen im Plättchen-Aβ hervor.
<p>BACE</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Niedrigere β-Sekretase-Expression bei AD-Patienten - Erhöhung in frühen und späten AD-Phasen, die zu erhöhter Thrombinaktivierung führen \rightarrow Neurodegeneration 	<ul style="list-style-type: none"> - Kontroverse Studienlage
<p>Disintegrin und Metalloprotease</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ADAM als α-Sekretasen erniedrigt in AD-Thrombozyten - Zusammenhang zwischen ADAM-Expression und räumlich visueller Wahrnehmung 	<ul style="list-style-type: none"> - Kontroverse Studienlage - Unklar, auf welcher Ebene ADAM reduziert ist, Transkriptionsebene scheint nicht betroffen
<p>PLA2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - APP stimuliert die PLA2-Aktivierung und umgekehrt stimuliert PLA2 die APP-Sekretion - Erhöhung/Erniedrigung der PLA2 in AD-Thrombozyten? - Erniedrigte PLA2-Aktivität korreliert mit früherem Beginn der AD und schnellerem kognitiven Abbau - Erhöhte PLA2-Aktivität führt zu vermehrter neuronaler AD-Pathologie 	<ul style="list-style-type: none"> - Kontroverse Studienlage - Scheint eher in der Konsequenz aus AD-Pathologien verändert zu sein, nicht ursächlich

Der Bedarf an Biomarkern, die die Entwicklung einer AD frühzeitig und treffsicher diagnostizieren können, ist für das Aufhalten der Erkrankung und Entwicklung wirksamer Therapien ebenso wichtig, wie ein klares Verständnis der Pathophysiologie.

Bei einer multifaktoriellen Erkrankung wie der AD ist Präzisionsmedizin auch insofern relevant, als dass Erkenntnisse über verschiedenste pathophysiologische Akteure, sei es im Blut oder speziell in Thrombozyten, Zusammenhänge über den Krankheitsprogress zu Tage fördern, neue Forschungsfelder eröffnen und damit auch frühzeitige Diagnose und Therapie ermöglichen¹⁸⁴.

1.3 Inflammation im Blut der Alzheimer-Patienten

Im Gehirn von Alzheimer Patienten führt ein verringerter zerebraler Blutfluss durch zelluläre Schädigungen und oxidativem Stress zur Aktivierung von Mikroglia und damit zu neuroinflammatorische Prozessen¹⁸⁵. Ist die Mikroglia chronisch aktiviert, werden pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6) freigesetzt, die dann einen Neuronenuntergang induzieren. Neuronenuntergänge wiederum aktivieren erneut die Mikroglia, die dann weiter inflammatorische Zytokine produzieren¹¹¹. Diese Neuroinflammation triggert die vermehrte Bildung und Ablagerung von Tau-Fibrillen und A β , was den Circulus vitiosus aufrechterhält und zu einer chronischen Entzündung führt^{38, 185}. Auch umgekehrt kann extern verursachte systemische Inflammation mit den immunologischen Prozessen bei AD interagieren und den Krankheitsprozess vorantreiben¹⁸⁶. Weiterhin ist A β in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren und mit Immunzellen zu interagieren, was auch eine periphere Inflammation bei AD-Patienten nahe legt¹⁸⁷. Zentrale und periphere Entzündungsreaktionen können kommunizieren; Zytokine überqueren entweder eine nicht-intakte Blut-Hirn-Schranke, oder aber sie stimulieren das Endothel, das wiederum Signale an perivaskuläre Makrophagen weitergibt und Mikroglia aktiviert¹⁸⁸. Eine dritte Möglichkeit besteht durch vagale Stimulation, die durch periphere Entzündung entsteht¹⁸⁹. Die systemische Entzündung zeigt sich auf verschiedene Weise in zahlreichen Studien¹⁹⁰⁻¹⁹² und trägt vermutlich zur Krankheitsprogression der AD bei, ihre ätiologische Bedeutung ist aber umstritten¹⁹⁰.

Auch NSAIDs wurden als protektiv für AD beschrieben, auch wenn die Erkenntnisse nicht eindeutig sind und die Wirkweise nicht geklärt ist. So scheinen Entzündungs-Pathways eine entscheidende Rolle in der Entstehung und frühen Phasen der AD zu spielen, in denen NSAIDs einen präventiven Effekt haben, sobald die Krankheit jedoch manifest ist, zeigt sich kein Effekt mehr^{4, 193}. Der Circulus vitiosus aus Inflammation und konsekutiver A β -Produktion und umgekehrt könnte möglicherweise durch die

cholinergen anti-inflammatorischen Signalwege durch AChE-I unterbrochen werden¹⁹⁴.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Untersuchung der Frage nachgegangen, ob das periphere inflammatorische Niveau, gemessen über die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF, bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen tatsächlich erhöht ist, und ob sich dies im Verlauf der AChE-I Therapie verändert.

Darüber hinaus interagieren auch Plättchen als Verbindung zwischen Entzündung, Thrombose und Atherogenese. Besonders bei Atherosklerose ist der Einfluss von Thrombozyten auf chronische Entzündungsprozesse bereits untersucht¹⁹⁵, weswegen auch vor diesem Hintergrund nicht nur die thombozytäre Funktion, sondern auch das inflammatorische Zytokinniveau bestimmt werden soll.

1.4 Hypothesen und Zielsetzung

Die oben eingeführten Erkenntnisse legen eine Veränderung der Thrombozytenfunktion von AD-Patienten nahe, jedoch ist die Literatur kontrovers. Einige finden eine verstärkte Aktivierung der Thrombozyten, aber auch eine verringerte Aktivierung wird beschrieben. Die thombozytäre Aktivierung erfolgt über viele verschiedene Stimuli und intrazelluläre Wege und auch die Verflechtung der AD mit den Thrombozyten scheint über verschiedene Wege möglich zu sein: Zum einen ähneln sich die pathogenetischen Akteure im Gehirn und den Plättchen, was eine Involvierung in die Pathologie aus Amyloid-Kaskade und Tau nahelegt. Zum anderen spielt auch das cholinerge System eine entscheidende Rolle für die Thrombozytenfunktion und auch die kognitiven Veränderungen im Gehirn. Auch eine generelle Entzündungssituation bei AD scheint einen Einfluss auf Thrombozyten zu haben, wenn sie nicht sogar ursächlich beteiligt sein könnten. Wie genau die verschiedenen Akteure miteinander verflochten sind, ist noch unklar.

Mit Hilfe dieser Arbeit soll eine umfassende Analyse der Thrombozytenfunktion und -degranulation, sowie dem inflammatorischen Niveau und verschiedenen Parametern des Blutbildes erfolgen. Hierbei soll genauer geklärt werden, in welchem Ausmaß sich die Thrombozytenfunktion unter AChE-I Therapie verändert. In vielen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wird ein einzelner Marker stellvertretend für die Thrombozytenfunktion gemessen. Da dies der Komplexität der

Thrombozytenaktivierung nicht ausreichend Rechnung trägt, wird hier ein umfassenderer Ansatz gewählt.

Aufgrund der dargestellten Interaktionen zwischen der Alzheimer-Pathologie, den Thrombozyten und der (Neuro-)Inflammation war es Ziel dieser Arbeit, die Thrombozytenfunktion der Alzheimer-Patienten genauer zu untersuchen und daraus Implikationen für a) die Wirksamkeit der anticholinergen Therapie, aber auch b) der Entwicklung möglicher thrombozytärer Biomarker abzuleiten.

Daher wird in dieser Arbeit zunächst die Thrombozytenfunktion von unbehandelten Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen verglichen. Eine Veränderung des cholinergen Systems, neuronal und extraneuronal, legt eine Veränderung der Thrombozytenfunktion bei AD-Patienten nahe. Hierzu wird die Thrombozytenaggregation unter Stimulation über verschiedene Agonisten mittels Vollblutaggregometrie untersucht. Außerdem wird die Thrombozytendegranulation über Messung der Expression verschiedener Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht. Beide Untersuchungen werden sowohl an unbehandelten AD-Patienten und gesunden Kontrollen, die aus dem unmittelbaren Umfeld der Patienten stammen (Lebenspartner) durchgeführt. Im Anschluss wird die Veränderung der Thrombozytenfunktion unter Einnahme von AChE-I bei den AD-Patienten untersucht. Dazu werden die gleichen Untersuchungen bei den AD-Patienten longitudinal, nach ca. einem, drei und sechs Monaten Therapie mit AChE-I durchgeführt. Zusätzlich zu den genannten Parametern werden jeweils die Plättchenzahl und -indizes sowie Erythrozytenzahl, Hb und Erythrozytenindizes erfasst. Um ebenfalls Einflüsse der Therapie auf das inflammatorische Niveau der AD-Patienten zu detektieren, werden die Leukozytenzahl mit Differentialblutbild, sowie inflammatorische Zytokine mittels ELISA bestimmt.

Sollten sich die Thrombozytenfunktion und andere Parameter des großen Blutbildes sowie das inflammatorische Niveau von AD-Patienten von den gesunden Kontrollen unterscheiden, wäre dies ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass die AD keine rein neuronale, sondern eine systemische Erkrankung ist. Durch ein besseres pathophysiologisches Verständnis und Möglichkeiten der AD-Diagnose im peripheren Blut könnten die gewonnenen Erkenntnisse außerdem als Basis für neue Forschung zu Therapieoptionen dienen. Sollte die Einnahme von AChE-I einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion der Patienten im Therapieverlauf haben, kann dies neue

Erkenntnisse über die Therapie mit AChE-I und potenzielle Verbesserungen im Einsatz eröffnen.

Hypothesen:

- Die Thrombozytenfunktion von Alzheimer-Patienten unterscheidet sich von gesunden Kontrollen mit gleichen Umweltfaktoren
- Die Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren hat Einfluss auf die Thrombozytenfunktion.
- Thrombozytenfunktionsparameter und Blutbildparameter können einen potenziellen Biomarker für die AD-Diagnose darstellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

2.1.1 Rekrutierung der Studienpopulation

Um Alzheimer-Patienten mit gesunden Kontrollen zu Vergleichen, wurden 51 Patienten von einer Fachärztin der Gerontopsychiatrie im Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim, rekrutiert. Als gesunde Kontrollen wurden 33 Lebenspartner/innen der Patienten ebenfalls eingeschlossen.

Die Demenz wurde nach ICD-10 Kriterien definiert. Durch eine ausführliche Anamnese und Untersuchung wurden andere Ursachen für die Demenz, wie Depression und Delir ausgeschlossen. In der Diagnostik wurden sowohl Patienten als auch gesunde Kontrollen einer umfassenden neuropsychiatrischen Testbatterie, einer ausführlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung unterzogen. Das allgemeine Funktionslevel wurde zunächst mit dem Mini-Mental State Test (MMSE) durch eine erfahrene Gerontopsychiaterin geprüft. Weiter wurden die neuropsychiatrischen Tests des „Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease“ (CERAD), die „Wechsler Memory Scale“ (WMS), sowie der „Trail-making-test“ (TMT) A und B durchgeführt.

Weiterhin wurden 3T-MRT-Untersuchungen durchgeführt, die von erfahrenen Neuroradiologen auf eine Atrophie des Temporallappens, eine globale kortikale Atrophie, Hyperintensitäten der weißen Substanz und Mikroblutungen (definiert als kleine, <10mm hypointense Foci im Gehirnparenchym) untersucht wurden. Die gesunden Kontrollen wurden hauptsächlich aus den Lebenspartnern der AD-Patienten gewählt, da so vergleichbare Umweltfaktoren und Lebensbedingungen, sowie ein ähnliches Alter gewährleistet werden konnte. Weder Patienten noch Kontrollen nahmen Medikamente, die die Thrombozytenfunktion stark beeinträchtigt, wie neue orale Antikoagulantien, Acetylsalicylsäure, nicht-steroidale Anti-Rheumatika (NSAID) und selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI). Die Thrombozytenfunktion wurde direkt nach Blutentnahme (siehe Methoden Teil 2.3.1f.) getestet.

Um die Auswirkung des AChE-I Rivastigmin auf die Thrombozytenfunktion zu untersuchen, wurde dieselbe Testung erneut nach einem, drei und sechs Monaten nach Beginn der Therapie durchgeführt.

2.1.2 Ethikantrag

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission II der Universität Heidelberg der medizinischen Fakultät Mannheim gemäß den gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien geprüft und genehmigt (Votum mit Aktenzeichen 2010-230N-MA vom 22.04.2010). Von allen Teilnehmern der Studie oder ihren gesetzlichen Vertretern wurde eine schriftliche Einverständniserklärung vor Studienbeginn unterschrieben.

2.1.3 Finanzierung

Teile der Studie wurden durch die Firma Novartis finanziell unterstützt, da es sich bei dem hier eingesetzten Acetylcholinesterase-Inhibitor um das Medikament Rivastigmin (Exelon®) handelt. Jedoch wurde weder Einfluss auf die Rekrutierung der Patienten oder die statistische Auswertung, noch auf die Anfertigung dieser Arbeit genommen.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

2.2.1.1 Kommerzielle Puffer, Medien und Substanzen

Tabelle 4 – Kommerzielle Puffer, Medien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung für Methode
Monovette® (EDTA KE/9ml, Citrat Coagulation 9NC/10ml, Hirudin/2.7ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Blutentnahme
Cell Wash Fertiglösung	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	Durchflusszytometrie
HEPES (Hydroxyethyl-Sulfonsäure - Puffer)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Durchflusszytometrie

2.2.1.2 Selbsthergestellte Puffer

Table 5 – Selbst hergestellte Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Methode
HBS-Puffer (Hepes Buffered Saline, pH 7,4)	150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgSO ₄ , 10 mmol/l Hepes	Durchflusszytometrie

2.2.1.3 Pharmakologische Substanzen

Table 6 – Pharmakologische Substanzen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung für Methode
ADP (ADPtest)	Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Schweiz	Vollblutaggregometrie (Multiplate®)
Arachidonsäure (ASPItest)	Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Schweiz	Vollblutaggregometrie (Multiplate®)
U46619, Thromboxan A ₂ - Analogon	Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA	Vollblutaggregometrie (Multiplate®), Durchflusszytometrie

2.2.2 Gebrauchsfertige Kits

Table 7 – Gebrauchsfertige Kits

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
High sensitivity (HS) ELISA IL-1 β	R&D Systems, Minneapolis, USA	Interleukinbestimmung
Cytometric Bead Array IL-6, TNF α	BD™ Biosciences, Immunocytometry Systems, San José, USA	Interleukinbestimmung

2.2.3 Kommerzielle Antikörper

Die Fluorochrome der für die durchflusszytometrischen Verfahren verwendeten Antikörper sind Phycoerythrin (PE) und Fluorescein isothiocyanat (FITC).

Tabelle 8 – Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluorochrom	Hersteller	Methode
CD41	PE	Beckman Coulter, Brea, USA	Durchflusszytometrie
CD62-P	FITC	Beckman Coulter, Brea, USA	Durchflusszytometrie
CD63	PE	Beckman Coulter, Brea, USA	Durchflusszytometrie
Pac-1	FITC	Beckman Coulter, Brea, USA	Durchflusszytometrie

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9 – Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Methode
Multiplate® Test Cells	Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Schweiz	Vollblutaggregometrie Multiplate®
Falcon™ Rundboden Polystyrolröhrchen	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland	Durchflusszytometrie

2.2.5 Geräte mit Workstations und Software

Tabelle 10 – Geräte mit Workstations und Software

Bezeichnung	Hersteller	Methode
BD FACSCalibur™	BD Biosciences, San José, USA	Durchflusszytometrie
CellQuest™	Beckton Dickinson Immuncytometry Systems, Heidelberg, Deutschland	Software- Durchflusszytometrie
Apple Macintosh Power PC	Apple Computer GmbH, München	Workstation, Durchflusszytometrie
Cell-Dyn® 3200	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland	Großes Blutbild

Multiplate®	Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Schweiz	Vollblutaggregometrie
Victor Multilabel Plate Reader	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA	HS Elisa – IL-1β
FCAP Array Analysis Software	BD™ Cytometric Bead Array	Cytometric Bead Array

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung des Blutes und Präparation der Thrombozyten

Die Blutentnahme wurde bei jeder Entnahme vom selben Arzt, verantwortlich für die Patientenrekrutierung im Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim durchgeführt. Es wurden Patienten mit der kürzlich erfolgten Diagnose der Alzheimer-Erkrankung eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme 10 Tage vor Abnahme keine Medikamente eingenommen hatten, die die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten verändern. Darunter fielen vor allem ASS und SSRIs.

Nach Abnahme und vor Nutzung des Blutes für weitere Experimente wurde es zunächst in Ruhe bei Raumtemperatur für 30 min vorinkubiert, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine reversible transportbedingte Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Für die Multiplate®-Analysen wurde Hirudinblut entnommen und das Vollblut nach Vorinkubation verwendet. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde Citratblut entnommen (Natriumcitratlösung 3,8 % w/v). Nach Vorinkubation wurden die Monovetten bei 150g (150fache Erdbeschleunigung) für 15min zentrifugiert und das plättchenreiche Plasma (PRP) vorsichtig aus dem Überstand extrahiert. Um eine Kontamination mit Leukozyten zu vermeiden, wurden nur ca. 80% des PRPs aus der Monovette entnommen. Es wurde eine Methode angewendet, bei der die Leukozytenkontamination in angereicherten PRP im Bereich von 0,1 Leukozyten pro μl Thrombozyten liegt^{196, 197}.

2.3.2 Messung der Thrombozytenaggregation

2.3.2.1 Messprinzip

Um die Thrombozytenaggregation im Vollblut zu messen wurde der „Multiple Platelet Function Analyser“ Multiplate® von Roche Diagnostics verwendet (Abbildung 4). Das impedanzaggregometrische Verfahren misst die Veränderung des elektrischen Widerstands zwischen zwei Elektroden. Das Testverfahren beruht auf einer Methode, die 1980 von Cardinal und Flower¹⁹⁸ entwickelt wurde. Durch das Haften von Thrombozyten auf fremder Oberfläche (in diesem Fall zwei mit Silber beschichteten Elektroden) und Zugabe von verschiedenen Agonisten aggregieren die Thrombozyten an den Elektroden. Die dabei gemessene Widerstandsänderung wird Impedanz genannt und verhält sich proportional zu Menge der Thrombozyten, die an den Elektroden haften¹⁹⁹.

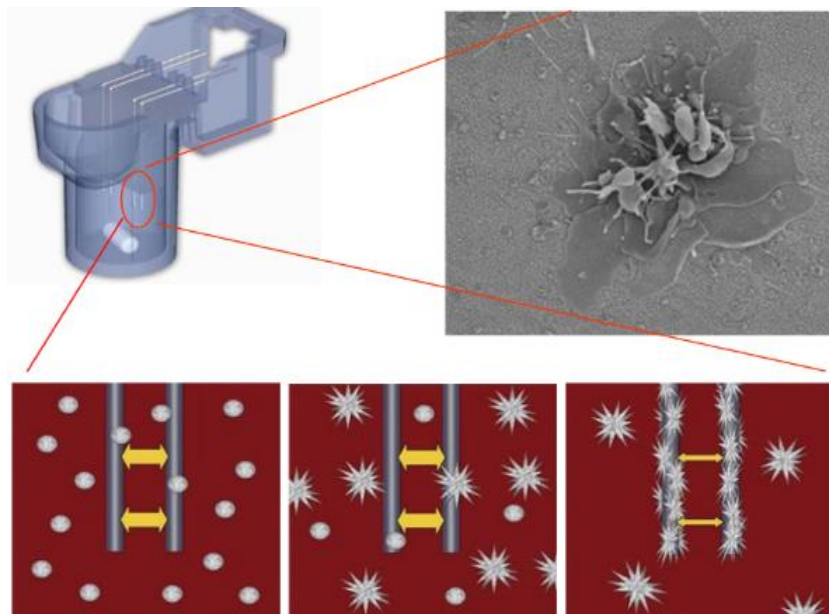


Abbildung 4 – Multiplate® Messprinzip

Schematische Darstellung der Thrombozyten-Anheftung und -Aktivierung an den Elektroden und dadurch mögliche Impedanzmessung. Abbildung aus: Calatzis et al. 2007, S.5¹⁹⁹

Das System wird zunächst auf 37,2 °C erwärmt, um eine physiologische Temperatur des Blutes während des Messverfahrens zu gewährleisten. Danach werden 300 µl hirudinisiertes Vollblut mit 300 µl physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) für 3 min inkubiert. Das Sensorsystem ist an einen PC mit entsprechender Auswertesoftware

gekoppelt. Die Aggregation wird in einem Graphen gezeigt, in dem sogenannte Arbitrary Units (AU) gegen die Zeit aufgetragen werden. Insgesamt zeichnet das System die Widerstandsänderung durch Aggregation innerhalb von 6 Minuten auf (Abbildung 5).

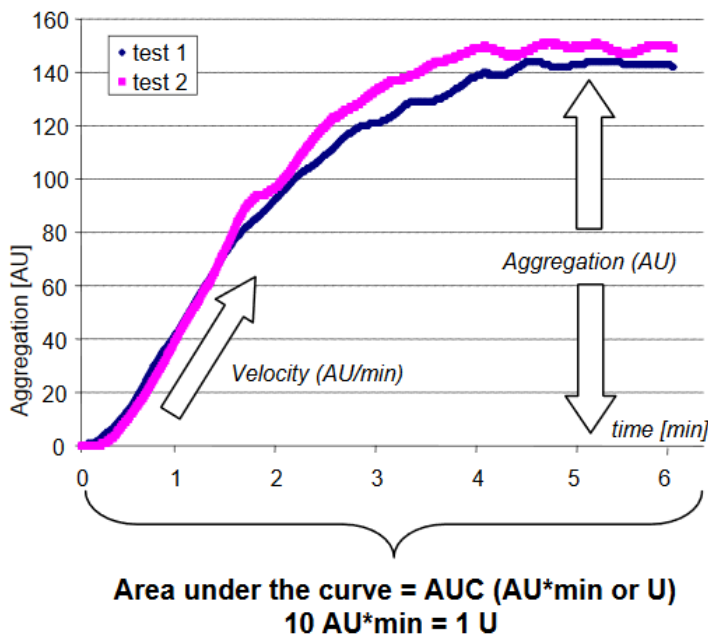


Abbildung 5 – Graphische Ausgabe der Ergebnisse

Über einen Zeitraum von sechs Minuten wird die Aggregation in Aggregationseinheiten (AU) gemessen. Dabei gibt die Software sowohl die Steigung als auch die maximale Aggregation aus.

Abbildung aus Calatzis et al. 2007, S.9¹⁹⁹

Die Software gibt drei Messwerte für jede Messung aus:

1. Die Area under the Curve (AUC); sie ist das arithmetische Mittel beider Messungen der Sensor-Elektroden einer Testzelle, angegeben in der Einheit AU/min oder U/min.
2. Die Aggregation einer Testzelle wird in Units (U) angegeben und stellt die Impedanzerhöhung während der kompletten Analyse dar (Maximale Höhe der Kurve).
3. Die Velocity bildet die maximale Steigung während der Impedanzänderung ab.

Nach der Messung wird von der Software überprüft, ob die beiden Kurven, die durch die Messung an den beiden Sensorelektrodenpaare ausgezeichnet wurden, sich um mehr als 20 % unterscheiden bzw. die Pearson-Korrelation unter 0,98 fällt. Ist dies der Fall, wird eine Fehlermeldung angegeben und die Messung wurde wiederholt. Die Sensorelektrodenpaare sind pro Küvette doppelt vorhanden, sodass eine Qualitätskontrolle schon im Messaufbau eingebaut ist.

Das Multiplate®-System erlaubt eine Aggregationsmessung im Vollblut, die innerhalb von 10 Minuten durchführbar ist. Außerdem können fünf Messungen gleichzeitig durchgeführt werden. Da bei Alzheimer-Patienten die Interaktion von veränderten roten und weißen Blutkörperchen mit Thrombozyten diskutiert wird²⁰⁰, bildet dieses Verfahren die Aggregationsfähigkeit in vivo am besten ab.

2.3.2.2 Thrombozytenstimulantien

Zur Aktivierung der Thrombozyten wurde dem Ansatz aus Vollblut und NaCl-Lösung nach 3 Minuten Vorinkubation bei 37,2°C je Messküvette ein Thrombozytenagonist hinzugefügt. Die Thrombozytenaktivierung wurde in dieser Studie mit 20µl 0,5mM Arachidonsäure (ASPItest, Roche), 15µl 5µM Adenosindiphosphat (ADP) (ADPtest, Roche), 7,5µl 0,75µM U46619 (Tocris) hervorgerufen (Abbildung 6).

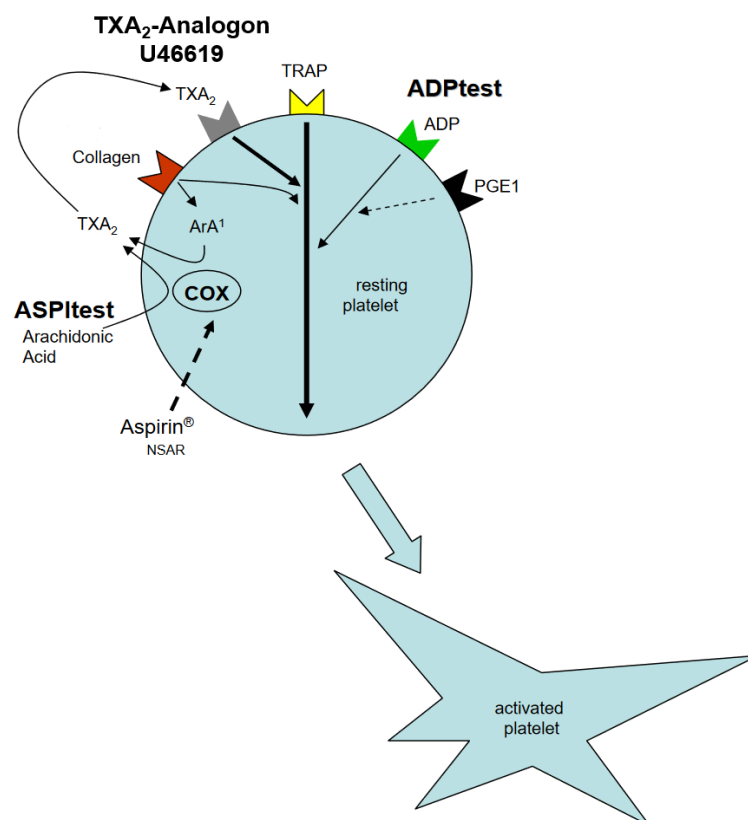


Abbildung 6 – Agonisten und ihre Aktivierungswege

Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung durch die in dieser Untersuchung verwendeten Agonisten Arachidonsäure (ASPItest), Adenosindiphosphat (ADPtest) und dem ThromboxanA2-Analagon (TXA2) U46619. Die Cyclooxygenase (COX) katalysiert hierbei die Umwandlung von Arachidonsäure zu TXA2.

Abbildung in Anlehnung an Calatzis et al. 2007, S.7¹⁹⁹

ASPItest:

Er enthält Arachidonsäure, was nicht direkt als Plättchenaktivator fungiert, aber durch die Cyclooxygenase (COX) in den wirksamen Thrombozytenaktivator Thromboxan A₂ überführt wird. Die COX gibt es in zwei Formen, wobei die COX-1 im gesamten Gewebe, auch in Thrombozyten vorkommt. Hier kann sie durch Acetylsalicylsäure (ASS) irreversibel gehemmt werden. Andere Agonisten können die Thrombozyten auch bei COX-Hemmung noch aktivieren, weshalb dieser Test in Kombination mit anderen die Hemmung der Thrombozyten durch ASS anzeigt. Dieser Test ist deshalb sensitiv gegenüber einer Hemmung der COX-1, aber auch einer Inhibierung (z.B.: durch Abciximab, Eptifibatid, Tirofiban) bzw. Fehlen des GPIIb/IIIa- Rezeptors, da dieser immer für die eigentliche Aggregation verantwortlich ist^{199, 201}.

ADPtest:

Er stimuliert die Adenosinrezeptoren der Thrombozyten mit ADP. Dieses Nukleotid ist auch in den Dichtegranula von Thrombozyten gespeichert und wird nach Aktivierung der Thrombozyten aus den Granula freigegeben. Das ADP bindet an den Purinrezeptoren P₂Y₁ und P₂Y₁₂. Auf deren Stimulation hin verändern die Glykoproteinrezeptoren GPIIb/IIIa ihre Konformation so, dass Fibrinogen binden kann und sich Thrombozytenaggregate ausbilden²⁰². Demnach ist dieser Test sensitiv für eine Hemmung am ADP-Rezeptor, aber auch eine Hemmung (z.B.: durch Abciximab, Eptifibatid, Tirofiban) oder das Fehlen des GPIIb/IIIa Rezeptors^{201, 203}.

U46619:

Alle Agonisten wurden zuvor in gebrauchsfertige Mengen (ASPI-Test und ADP-Test) aliquotiert und bei -30 °C gelagert, um ein häufiges Auftauen und Wiedereinfrieren und damit eine eventuelle kürzere Wirksamkeit der Substanzen zu vermeiden. U46619 wurde auf eine 60µM Arbeitslösung verdünnt und ebenfalls in gebrauchsfertigen Aliquots eingefroren.

Die Agonisten wurden stets auf Eis gelagert und langsam, erst vor direktem Gebrauch, aufgetaut und kurz gevortext, um eine homogene Agonistenlösung zu erreichen. Um die Funktionsfähigkeit der Agonisten zu testen, wurde in regelmäßigen, ca. zweimonatlichen Abständen eine Qualitätskontrolle durch Messung der Thrombozytenfunktion unter Stimulation mit oben genannten Agonisten bei einer Referenzperson durchgeführt.

Für die unstimulierte Messung der Impedanzveränderung wurde einer Küvette anstelle eines Agonisten 20µl physiologische Kochsalzlösung hinzugegeben. Dieses wurde ebenfalls bis kurz vor Verwendung auf Eis gelagert, um dieselbe Temperaturdifferenz wie die Agonisten zum Vollblut zu haben.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde die thrombozytäre Aktivierung und Degranulation gemessen. Als Maß für die Degranulation wurden die Oberflächenproteine P-Selectin und LAMP-3 verwendet. P-Selectin befindet sich in der Membran thrombozytärer alpha-Granula, Lamp-3 in der Membran thrombozytärer Lysosomen und Dichtegranula²⁰⁴. Sobald Thrombozyten im aktivierten Status degranulieren, verschmelzen die Membranen der Granula mit der äußeren Thrombozytenmembran, sodass sich oben genannte Proteine durch Einsatz von spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch auf der Thrombozytenoberfläche nachweisen lassen. Außerdem wurde als Aktivierungsmaß der Thrombozyten zusätzlich die Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors (Glykoprotein IIb/IIIa) mit dem Antikörper Pac-1 gemessen. Pac-1 bindet an ein Epitop am, oder Nahe des aktivierten Fibrinogenrezeptors, welcher aus dem Glykoprotein IIb (CD41) und dem Glykoprotein IIIa (CD61) besteht. Beide Proteine vollziehen bei Aktivierung der Thrombozyten eine Konformationsänderung und können dann mittels Pac-1 an der RGD-Erkennungssequenz (Aminosäuresequenz Arginin – Glycin – Aspartat) nachgewiesen werden²⁰⁵. Zudem wurde zur Bestätigung der Erfassung von Thrombozyten das Integrin αIIb (CD41) auf der Thrombozytenoberfläche bestimmt.

2.3.3.1 Messprinzip

Bei der durchflusszytometrischen Messung werden physikalische Zelleigenschaften genutzt, um Zellen einzeln zu identifizieren und mithilfe verschiedener Antikörper ihre Oberflächenstruktur genauer zu bestimmen. Zellen werden hierbei in einer Lösung so durch das Messinstrument geführt, dass ein Laserstrahl auf je eine Zelle trifft. Die Zellen fließen so nach und nach durch den Laserstrahl. Durch die Größe und Granularität bzw. Dichtebeschaffenheit der Zelle, wird Licht gestreut (Abbildung 7).

Je nach Wellenlänge (üblich sind 488 oder 405 nm) des Laserlichts und Zellgröße verändert sich die Streuung. Diese Lichtstreuung wird von zwei Detektoren gemessen. Einer davon befindet sich in Richtung des Laserlichts (forward scatter, FSC) und einer orthogonal zum Laserstrahl (side scatter, SSC). Aus der Kombination beider

Messungen lassen sich Zellpopulation voneinander abgrenzen, die sich in Größe und Granularität bzw. Dichte unterscheiden. Hierbei korreliert die FSC-gemessene Streuung mit der Größe, die SSC-gemessene Streuung mit der internen Komplexität einer Zelle, also ihrer Dichte und Granularität²⁰⁶.

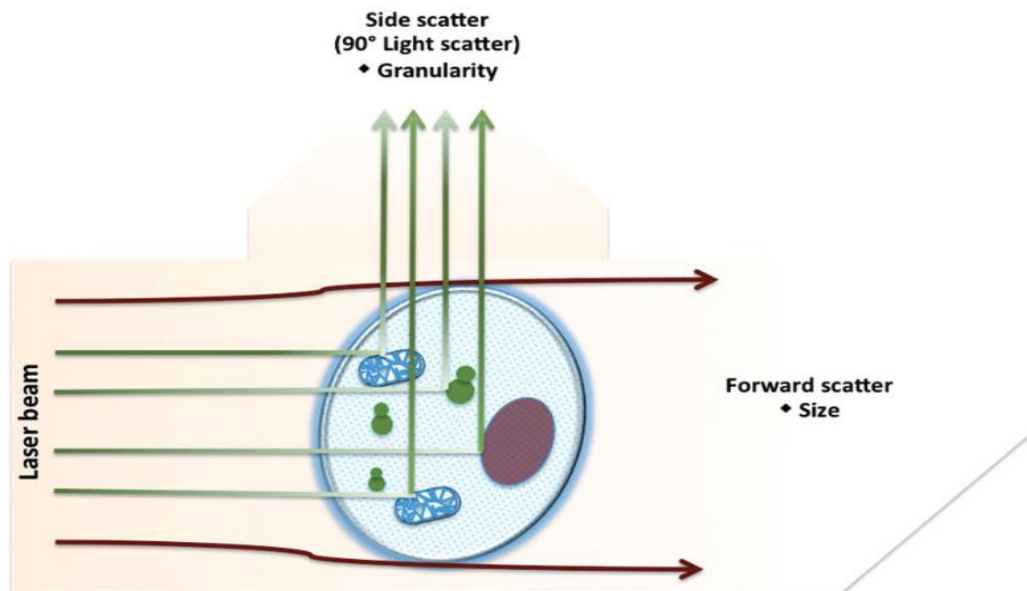


Abbildung 7 – Lichtstreuung in der Durchflusszytometrie.

Die Vorwärtsstreuung (forward scatter) ist proportional zur Größe der Zelle, die Seitwärtsstreuung (side scatter) zur Dichte und Granularität. Abbildung aus: Adan et al. 2016, Figure 2, S.165²⁰⁷

2.3.3.2 Ansatz für die Durchflusszytometrie

Für den durchflusszytometrisch verwendeten Ansatz wurde HBS-Puffer so vorgelegt, dass das Abschlussvolumen 100µl betrug (Tabelle 11 – Pipettierschema FACS Analyse). Danach wurden in den Ansätzen für die Messung nach Aktivierung mit den Thrombozytenagonisten 5µM ADP bzw. 5µM U46619 mit jeweils 10µl zum Ansatz gegeben. In diese Ansätze, sowie in die Ansätze für ungefärbte und unstimulierte Messungen wurden 10µl PRP hinzugefügt. Die Gewinnung des PRP erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben. Mit den entsprechenden, an ein Fluorochrom gebundenen Antikörpern (PE und FITC) wurden die Ansätze dann für 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert.

Tabelle 11 – Pipettierschema FACS Analyse (alle Volumina in μ l)

	Bezeichnung	HBS-Puffer	Agonist	PRP	CD63-PE	Pac-1-FITC	Gesamt-volumen
1.1	Ungefärbt	90		10			100
1.2	Unstimuliert	60		10	20	10	100
1.3	ADP 5 μ M	50	10	10	20	10	100
1.4	ADP 100 μ M	50	10	10	20	10	100
1.5	U46619 5 μ M	50	10	10	20	10	100
					CD62P-FITC	CD41-PE	
2.1	Ungefärbt	90		10			100
2.2	Unstimuliert	60		10	20	10	100
2.3	ADP 5 μ M	50	10	10	20	10	100
2.4	ADP 100 μ M	50	10	10	20	10	100
2.5	U46619 5 μ M	50	10	10	20	10	100

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 1ml Cellwash zu allen Ansätzen pipettiert und direkt im Anschluss die Rezeptordichte am FACS-Gerät (BD FACS-Calibur™) gemessen. Pro Ansatz wurden 20.000 Ereignisse gemessen. Die Thrombozytenpopulation wurde aufgrund der charakteristischen Lichtstreuung durch Ablenkung des Lasers aufgrund der Zellstruktur aus FSC und SSC identifiziert und in einem Rahmen („Gate“) eingegrenzt. Ausgewertet wurden die Messungen mit der „FACSScan“-Software, die aus Fluoreszenzstärke und Häufigkeit der gemessenen Ereignisse die mittlere relative Fluoreszenz (mean fluorescence intensity=MFI) errechnet.

2.3.4 Bestimmung des Inflammationsniveaus

Zur Feststellung des inflammatorischen Niveaus wurden die Zytokine Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) gemessen. Für die Bestimmung von IL-1 β wurde der High sensitivity ELISA von R&DSystems verwendet und nach Standard-Protokoll des Assay's durchgeführt. IL-6 und TNF α

wurden durchflusszytometrisch mittels Cytometric Bead Array (CBA) von BDBioscience durchgeführt.

2.3.4.1 Messprinzip

ELISA

Beim Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wird der Analyt an einen Erstantikörper auf der ELISA-Platte gebunden. Danach führt eine Bindung eines Zweitantikörpers an den Analyten zur enzymatischen Veränderung eines Farbsubstrats, dessen Farbveränderung gemessen werden kann und mit der Konzentration des Analyten korreliert (Abbildung 8).

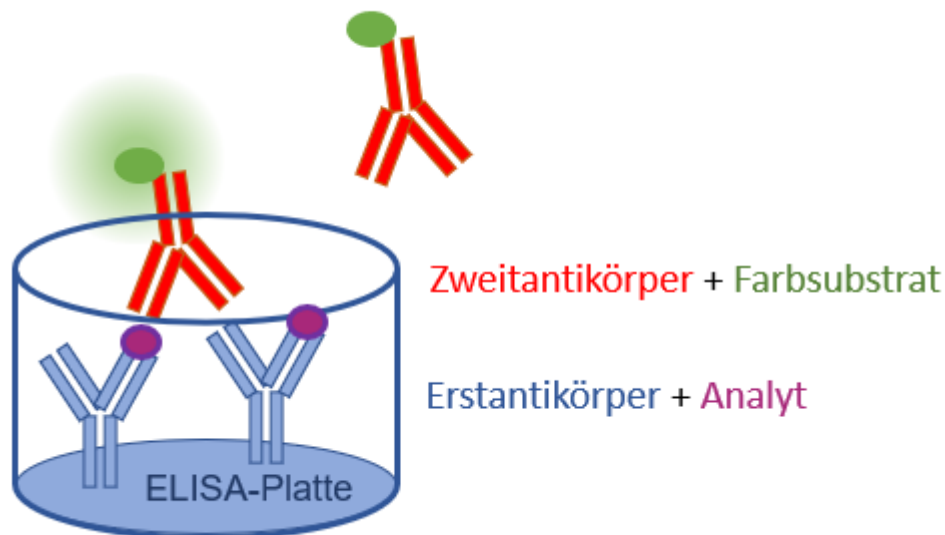


Abbildung 8 – Prinzip des Sandwich-ELISA

Der Erstantikörper bindet an der ELISA-Platte und wird wiederum von einem markierten Zweitantikörper gebunden. Eigene Grafik, angelehnt an: ELISA Guide, R&D Systems ²⁰⁸

Cytometric Bead Array

Der Cytometric Bead Array (CBA) hat eine ähnliche Funktionsweise wie der oben beschriebene ELISA. Der Vorteil von CBAs gegenüber den klassischen ELISAs ist, dass wesentlich mehr Analyten gemessen werden können. Bis zu 30 Proteine können gleichzeitig in volumenmäßig sehr kleinen Samples bestimmt werden (25 – 50 µl)²⁰⁹.

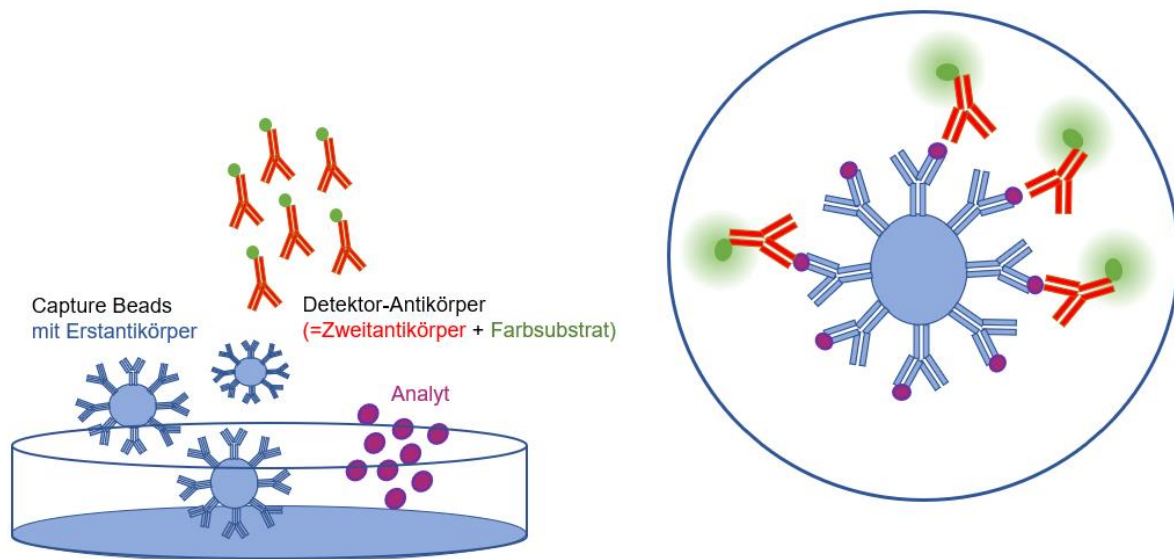


Abbildung 9 – Prinzip des Cytometric Bead Array

Der Analyt bindet an sogenannte Capture Beads, daran bindet wiederum ein Detektor-Antikörper. Die Detektor-Antikörper sind an ein Fluorochrom gebunden, dessen Intensität mittels Durchflusszytometrie gemessen werden kann. Eigene Grafik.

Die zu bestimmenden Proteine binden an kleine, mit für den Analyten spezifischen Antikörpern gebundene Partikel, sogenannte "capture beads". Diese capture beads haben eine spezifische Fluoreszenz und werden mit der zu untersuchenden Probe und Antikörpern gemischt, die den Analyten detektieren. Diese Antikörper sind an ein Fluorochrom gekoppelt (Phycoerythrin). Nach einer Inkubation und Waschen des Ansatzes wird die mediane Intensität der Fluoreszenz (MFI) mittels Durchflusszytometer bestimmt (Abbildung 9). Die FCAP Array Analysis Software bestimmt durch Interpolation der MFIs und der Standardkurve die Konzentration des Analyten²¹⁰.

2.3.5 Patientenausschluss

Zeigte sich bei Messungen unter Stimulation mit Arachidonsäure ein AUC Wert von <40 U in der Impedanzaggregometrie (Abbildung 10), wurden die Patienten nachträglich aus der Thrombozytenfunktionsanalyse ausgeschlossen, da sich hierbei eine kürzlich erfolgte Einnahme von Aspirin oder anderen COX-1 Hemmern nicht ausschließen lies¹⁹⁹. Dabei wurde die Grenze der Hemmung von COX-1 durch Aspirin und nicht der Normalbereich gewählt, um nicht fälschlicherweise Probanden

auszuschließen, deren Thrombozytenaggregation durch andere Einflussgrößen derart gehemmt worden waren. Alle Probanden versicherten, in den letzten zehn Tagen kein Aspirin oder ähnliche COX-1 Hemmer eingenommen zu haben.

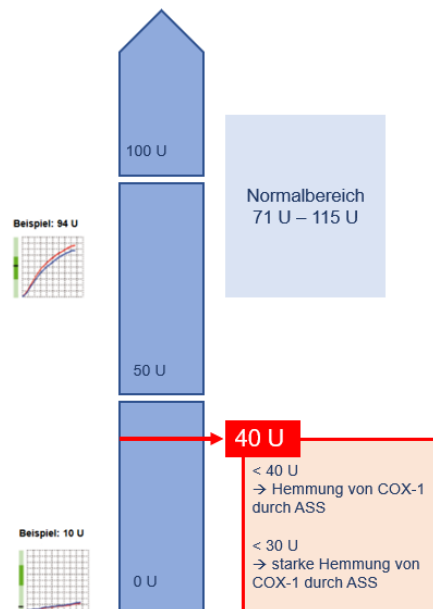


Abbildung 10 – Cut-off Werte beim ASPI-Test.

Messungen im Multiplate werden ausgegeben in Arbitrary Units (U). Nach Angaben des Herstellers kann nach Stimulation mit Arachidonsäure der Thrombozyten in hirudinisiertem Vollblut ab einem Messwert von <40 U von einer durch Acetylsalicylsäure (ASS) gehemmten Cyclooxygenase (COX-1) und damit verminderten Thrombozytenaggregation ausgegangen werden. Grafik angelehnt an Roche Multiplate Smartcard, Roche Diagnostics GmbH, 2012 ²¹¹

2.4 Statistische Auswertung

2.4.1 Gruppierung der Verlaufsmessungen

Bei den Verlaufsbeobachtungen unterscheiden sich die Patienten sowohl in der Zeit der Rivastigmin-Anwendung als auch in der Dosis. In der Literatur gibt es Hinweise auf Effekte, die sowohl zeit-, als auch dosisabhängig sind. Vor allem bei Rivastigmin hat eine höhere Dosis einen besseren Effekt als Placebo^{124, 212}. Da die interindividuellen Veränderungen der Patienten erfasst werden sollten, lag eine Gruppierung anhand der Nummer der Verlaufsmessung nahe (Abbildung 11).

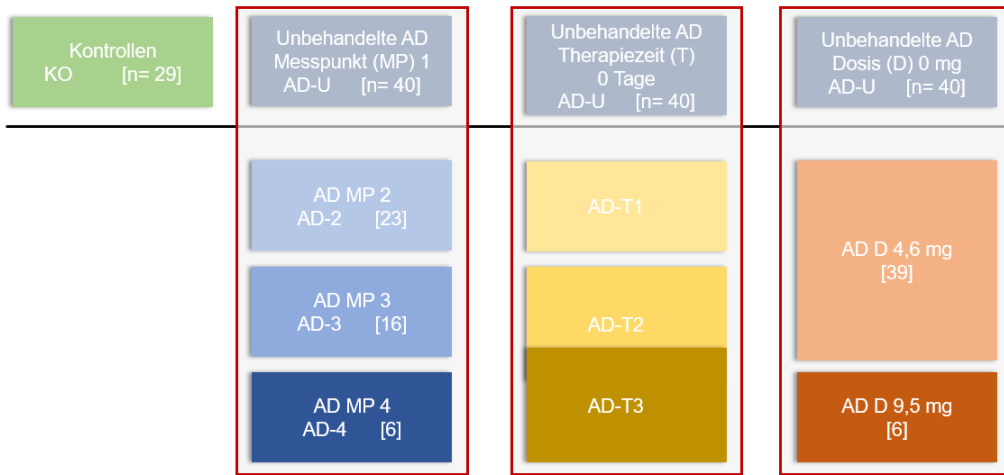


Abbildung 11 – Mögliche Gruppierungen der Datenmenge

Nach Ausschluss aller Dropouts und anderweitig auszuschließender Patienten/Kontrollen.

Nicht bei jeder Probe ging die Gruppierung anhand der Nummer der Verlaufsmessung mit derselben Dosis und demselben Behandlungsintervall einher. Daher musste zunächst geprüft werden, welche Gruppierung sich bei diesen Voraussetzungen eignet.

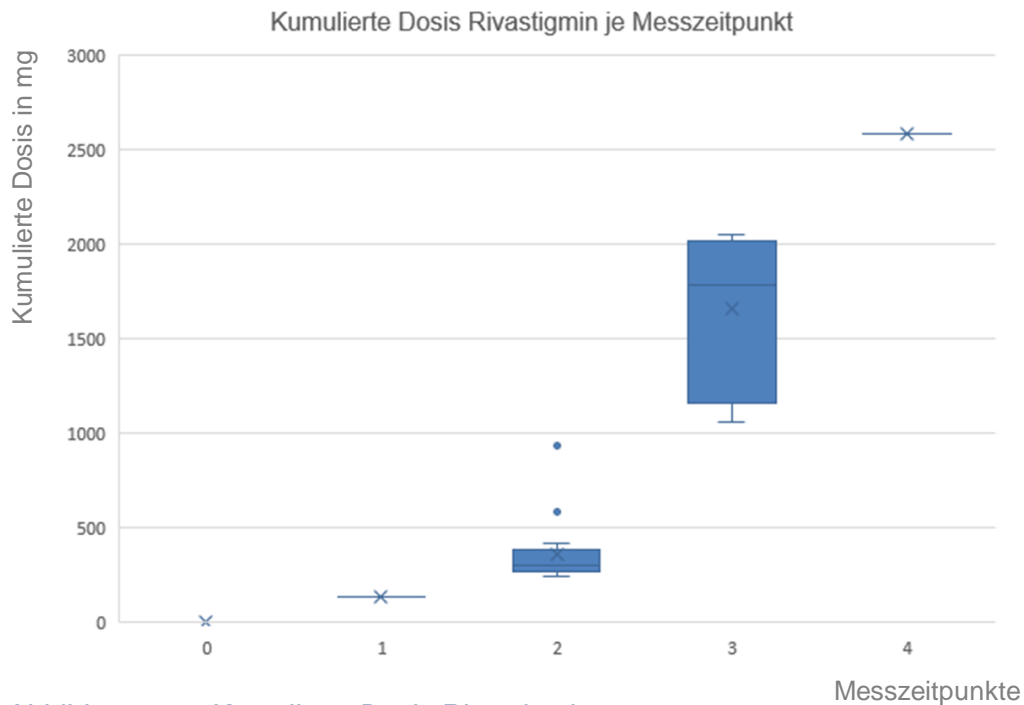


Abbildung 12 – Kumulierte Dosis Rivastigmin

In der Darstellung der kumulierten Dosis (Tagesdosis x Tage der Rivastigminanwendung) je Messzeitpunkt wird deutlich, dass sich die Gruppen nicht überschneiden, auch wenn die Therapiezeit in Tagen zu den unterschiedlichen Messpunkten variiert.

Da die kumulierte Dosis (kumulierte Dosis= Therapietage * jeweilige Tagesdosis) mit der Nummer der Verlaufsmessung korreliert und eine klare Gruppeneingrenzung ohne Überschneidungen ermöglicht, wurde für die statistische Auswertung die Nummer der Verlaufsmessung, die auch die kumulierten Dosen in Gruppen unterscheidet, als gruppierendes Element verwendet (Abbildung 12). Allerdings zeigen sich bei der Betrachtung der Therapiezeit (Abbildung 13) bzw. der Therapiedosis (Abbildung 14) deutlich Überschneidungen der Gruppen bei zwei Proben. Die zwei Proben zu Messzeitpunkt 2, die deutlich aus der Gruppe heraustreten (Verlaufsmessung 2 bei ZIGA081 und ZIGA089), wurden deshalb ausgeschlossen, um mögliche Verfälschungen zu vermeiden. Ebenfalls wird die Probe zu Messzeitpunkt 4 ausgeschlossen, weil die singuläre Probe nicht für einen statistischen Gruppenvergleich verwendet werden kann.

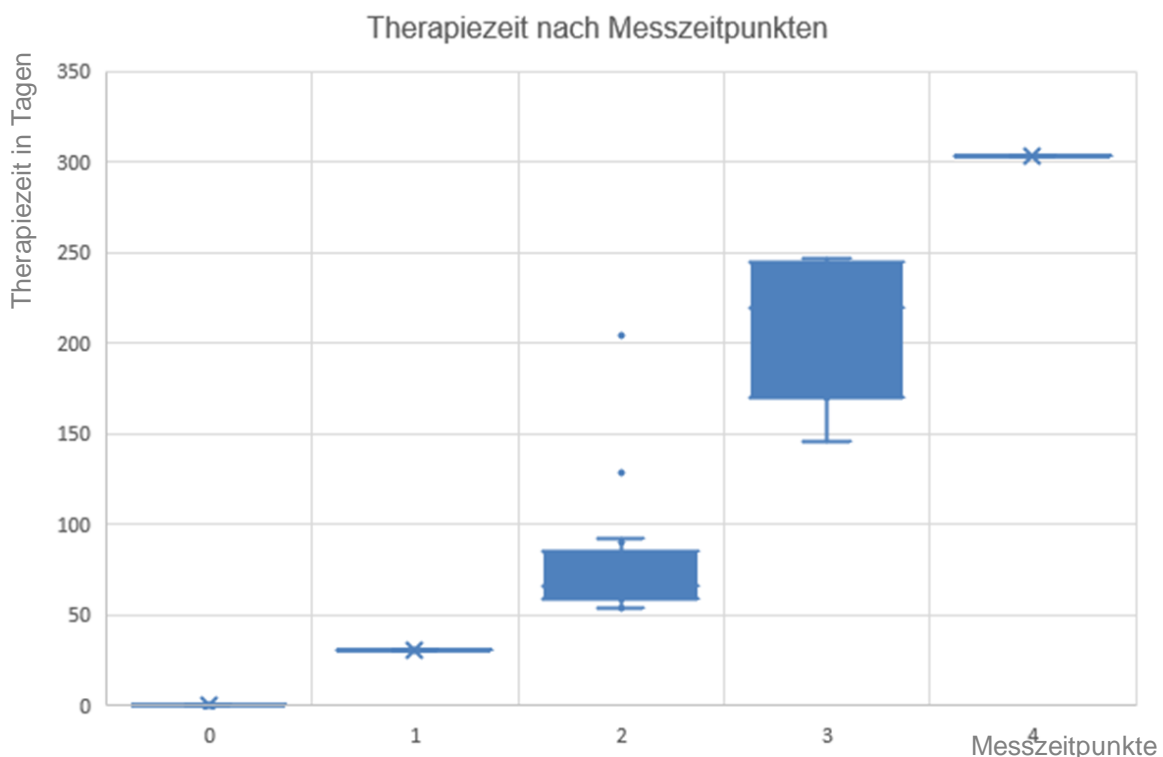


Abbildung 13 – Therapietage aufgetragen auf Verlaufsnummer

Eine exakte Blutentnahme und Messung nach einem Monat gelang, der Zeitabstand zu Messzeitpunkt 2 und 3 gelang aus Gründen der Terminvergabe nicht exakt. Die Proben, die aufgrund der längeren Therapiedauer aus der Gruppe zu Messzeitpunkt 2 ausreißen, wurden in der Auswertung exkludiert. Eigene Darstellung.

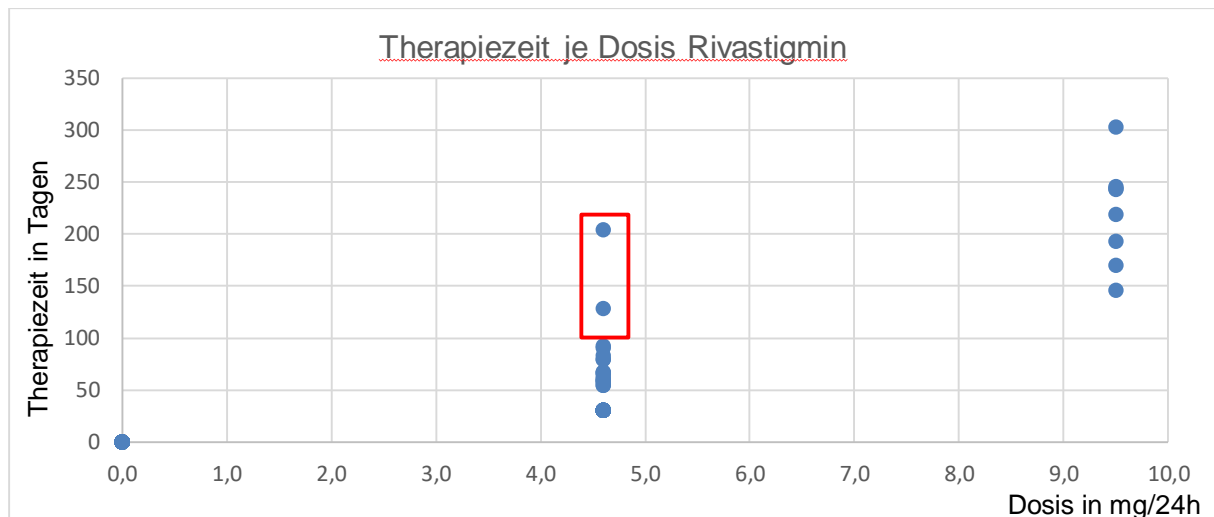


Abbildung 14 – Therapiezeit aufgeteilt nach Pflasterdosis-Gruppe

Die Therapiedosis reicht von 4,6 mg/24h bis 9,5mg/24h. Die Anpassung erfolgte bedarfsadaptiert und zeitadaptiert durch fachärztliche Entscheidung. Die Verteilung der Dosisgruppe aufgetragen nach Therapietagen erlaubt eine Zuordnung niedrigerer Dosis zu kürzerer Therapiezeit und umgekehrt. Die rot markierten Proben, deren Therapiezeit die der Dosisgruppe überschreitet wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

2.4.2 Gruppenvergleich der Kontrollen mit Alzheimer-Patienten

Für den Gruppenvergleich der gesunden Kontrollen mit unbehandelten Alzheimer-Patienten sowie mit Alzheimer-Patienten im Therapieverlauf erfolgte die statistische Auswertung mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 25 (SPSS Inc., Chicago, USA). Für alle Parameter wurden zunächst der Kolmogorov-Smirnov-, als auch der Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung durchgeführt. Bei normalverteilten Variablen wurde dann ein Mittelwertvergleich zwischen gesunden Kontrollen (KO) und unbehandelten Alzheimer-Patienten (AD-MP0) mit dem ungepaarten studentischen T-Tests durchgeführt. Waren die Daten der Variablen nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen. Ebenso wurden die Gruppenvergleiche der KO mit der jeweiligen Behandlungsgruppe (AD-MP1, AD-MP2, AD-MP3) nach diesem Verfahren durchgeführt.

2.4.3 Analyse der thrombozytären Merkmale abhängig vom Therapiestatus

Die Analyse der Thrombozytenfunktionsparameter im Verlauf der AChE-I Einnahme wurde von der Abteilung für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung der medizinischen Fakultät Mannheim durchgeführt. Die Verlaufsmessungen erforderten als Longitudinaldaten die Berechnung von linearen gemischten Modellen. Hierfür wurde die Statistiksoftware SAS verwendet.

Alle Merkmale wurden mittels Shapiro-Wilk Test und unter Analyse des Modus, Median und Mittelwerts sowie Stamm-Blatt-Diagrammen auf Normalverteilung geprüft. Ausreißer, die stark von der Datenmenge abwichen, wurden ausgeschlossen, um eine annähernde Normalverteilung zu erreichen.

Auf Basis des bereinigten Datensatzes wurden lineare gemischte Modelle berechnet, in denen zunächst auf einen Unterschied innerhalb der Gruppen KO, AD-MP0, AD-MP1, AD-MP2 und AD-MP3 untersucht wurde und post-hoc mittels Dunnett-Hsu-Test einzelne Gruppen untereinander verglichen wurden. Im zweiten Schritt wurde ein gemischtes Modell berechnet, welches die Unterschiede der Verlaufsmessungen aufzeigt (AD-MP0, AD-MP1, AD-MP2, AD-MP3). Hier wurde post-hoc mittels Tukey-Kramer-Test der Effekt in einem Einzelgruppenvergleich stratifiziert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Deskriptive Ergebnisse zur Studienpopulation

Es wurden 51 AD-Patienten und 33 gesunde Kontrollen in die Studie eingeschlossen. Aufgrund von Rivastigmin-Pflasterunverträglichkeiten, fehlender weiterer Therapie im Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Medikamenteneinnahmen, die mit der Thrombozytenfunktion interferierten und damit einen Ausschluss erforderten oder aus unbekanntem Gründen, die zu einem Austritt aus der Studie führten, konnte bei 23 Patienten keine weitere Blutentnahme im Rahmen dieser Studie durchgeführt werden. 28 Patienten wurden erneut zu einem Zeitpunkt ca. 1 Monat nach Therapiebeginn untersucht, allerdings konnte aus koordinativen Gründen das geplante 1-Monats-Fenster nicht immer genau eingehalten werden. Bei 18 Patienten fand eine dritte Blutentnahme und Untersuchung statt, bei 7 Patienten eine vierte (Abbildung 15).

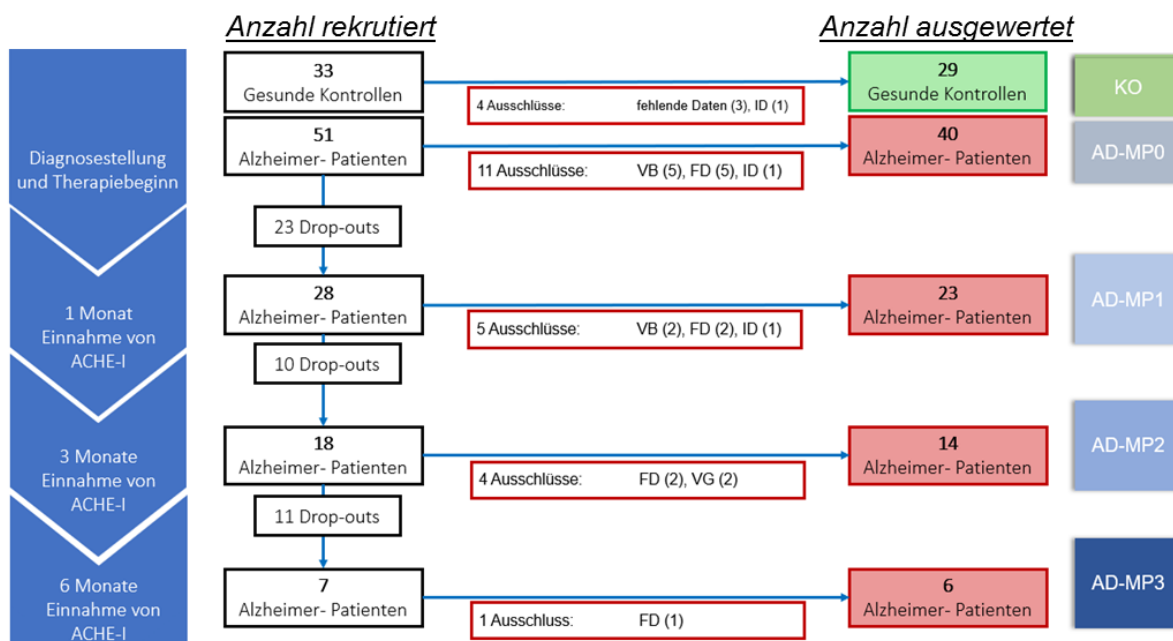


Abbildung 15 – Patienteneinschluss und Drop-outs

VB – Ausschluss aufgrund von Vorbehandlung mit Acetylcholinesterase-Hemmern (ACHE-I); FD – Ausschluss aufgrund von falscher Diagnosestellung; ID – Ausschluss aufgrund von fehlerhaft vergebender ID; VG – Ausschluss aufgrund von Ausreißen aus der Verlaufsgruppierung; Im Folgenden verwendete Abkürzungen für die jeweilige Verlaufsgruppe siehe Kasten am rechten Rand der Abbildung.

Vor der statistischen Auswertung ergaben sich weitere Gründe für den Ausschluss einiger Patientendaten: Eine nachträglich festgestellte stattgefundenen Vorbehandlung

mit AChE-I führte ebenso wie eine durch weitere Diagnostik nachträglich festgestellte falsche Diagnose der AD zu einem Ausschluss. Darüber hinaus wurde in einem Fall eine ID falsch vergeben und zwei Verlaufsmessungen wurden ausgeschlossen, weil die Blutentahmezeitpunkte zu stark vom Rekrutierungsmuster abwichen.

Die Diagnose der Alzheimer-Demenz wurde nach aktuellen Leitlinien von erfahrenen Gerontopsychiatern in einer Konsensusdiagnose gestellt. Die Gruppen der Alzheimer (AD)-Patienten und gesunden Kontrollen (KO) waren in den erfassten deskriptiven Merkmalen, außer in ihrem MMSE-Ergebnis, vergleichbar (Tabelle 12 – Demographische Daten im Vergleich der Gruppen).

Tabelle 12 – Demographische Daten im Vergleich der Gruppen

		Gesunde Kontrollen		Alzheimer-Patienten	
		N =29	Mittelwert ± SD	N= 40	Mittelwert ± SD
Geschlecht	F	16		19	
	M	13		21	
Alter			70,3 ± 7,4		70,4 ± 7,8
Größe			169,8 ± 8,9		167,7 ± 9,3
Gewicht			72,9 ± 12,1		72 ± 11,2
BMI			25,18 ± 2,84		25,59 ± 3,49
MMSE*			30 ± 1		22 ± 4

*Gruppen unterscheiden sich signifikant $p < 0,001$; SD = Standardabweichung; BMI = Body Mass Index; MMSE = Ergebnis des Mini-Mental-State-Tests

3.2 Thrombozytenaggregation im Multiplate®

3.2.1 Unbehandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen

Die Feststellung der Thrombozytenaggregation erfolgte mithilfe der Vollblutaggregometrie. Während sich die unstimulierte Plättchenaggregation in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied, zeigte sich die ADP-induzierte Aggregation niedriger bei unbehandelten AD-Patienten (AD-MP0) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (KO) ($58,28 \pm 24,2$ U versus $69,97 \pm 23,77$ U; $p=0,047$). Ebenso verhielt es sich mit der Thrombozytenaggregation unter Stimulation mit Arachidonsäure (AA) ($72,35$ U \pm $24,63$ versus $83,76$ U \pm $23,48$, $p=0,022$) (Tabelle 13). Eine bivariate Korrelationsanalyse ergab eine Korrelation zwischen Plättchenanzahl und der

Thrombozytenaggregation, repräsentiert durch die Fläche unter der Aggregationskurve) (AA_AuC ~ Plt: Pearson: 0,356. ADP_AuC~ Plt: Pearson: 0,446, signifikant auf dem Niveau $p < 0,01$ zweiseitig). Ebenfalls korrelierte die Anzahl der Leukozyten mit allen Aggregationsmessungen (a) AA_AuC, (b) ADP_AuC, (c) U46619_AuC und der (d) Plättchenanzahl: Pearson a) 0,359, b) 0,508, c) 0,478; signifikant auf dem Niveau $p < 0,01$, zweiseitig sowie d) 0,241, signifikant auf dem Niveau $< 0,05$, zweiseitig.

Tabelle 13 – Ergebnisse Multiplate® Vergleich KO (n=29) vs. AD-U (n=40).

Parameter	Gruppe	Mittelwert ± SD	Shapiro-Wilk	T-Test	U-Test
Unstimuliert (RUO)	KO	27,3 ± 18,2	0,088	0,873	0,687
	AD-U	28,0 ± 15,2			
Unstim. (AuC)	KO	13,8 ± 11,8	<0,001	0,496	0,956
	AD-U	12,1 ± 7,5			
AA (RUO)	KO	160,9 ± 41,1	0,121	0,057	0,012
	AD-U	140,5 ± 44,6			
AA (AuC)	KO	83,8 ± 23,5	0,059	0,057	0,022
	AD-U	72,6 ± 24,6			
ADP (RUO)	KO	134,3 ± 42,5	0,016	0,068	0,044
	AD-U	114,0 ± 46,6			
ADP (AuC)	KO	70,0 ± 23,8	0,004	0,050	0,047
	AD-U	58,3 ± 24,2			
U46619 (RUO)	KO	133,9 ± 46,9	0,010	0,373	0,349
	AD-U	122,2 ± 57,8			
U46619 (AuC)	KO	61,2 ± 23,9	0,023	0,654	0,622
	AD-U	58,3 ± 30,4			
AA (rel. Akt.)	KO	16,2 ± 22,6	<0,001	0,551	0,313
	AD-U	13,1 ± 19,5			
ADP (rel. Akt.)	KO	13,5 ± 19,6	<0,001	0,259	0,310
	AD-U	9,2 ± 11,5			
U46619 (rel. Akt.)	KO	8,7 ± 19,5	<0,001	0,788	0,359
	AD-U	8,04 ± 9,2			

KO, gesunde Kontrollen; AD-MP, Alzheimer-Patienten zu verschiedenen Messzeitpunkten; AuC, Area under the Curve, Fläche unter der Kurve in Aggregations-Einheiten (AU); RUO; Anstiegsgeschwindigkeit (AU/min); rel. Akt., Relative Aktivierung (Rechenbeispiel:

$rel. Akt. AA = \frac{AA_{AuC}}{unstim. AuC}$); SD, Standardabweichung; Roter Kasten: verwendeter p-Wert nach Testung auf Normalverteilung

3.2.2 Behandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen

Unstimulierte Thrombozytenaggregation

Im unstimulierten Zustand aggregieren die Thrombozyten der Patienten im Multiplate zu den verschiedenen Messzeitpunkten während der Behandlung im Trend verschieden ($p=0,0501$) (Abbildung 16). Zunächst aggregieren sie stärker, dann wiederum bei Patienten zum Messzeitpunkt 3 weniger. Dabei lässt sich post-hoc durch den Tukey-Kramer-Test allein zwischen Messzeitpunkt 0 und 1 eine Tendenz ableiten ($p=0,0853$).

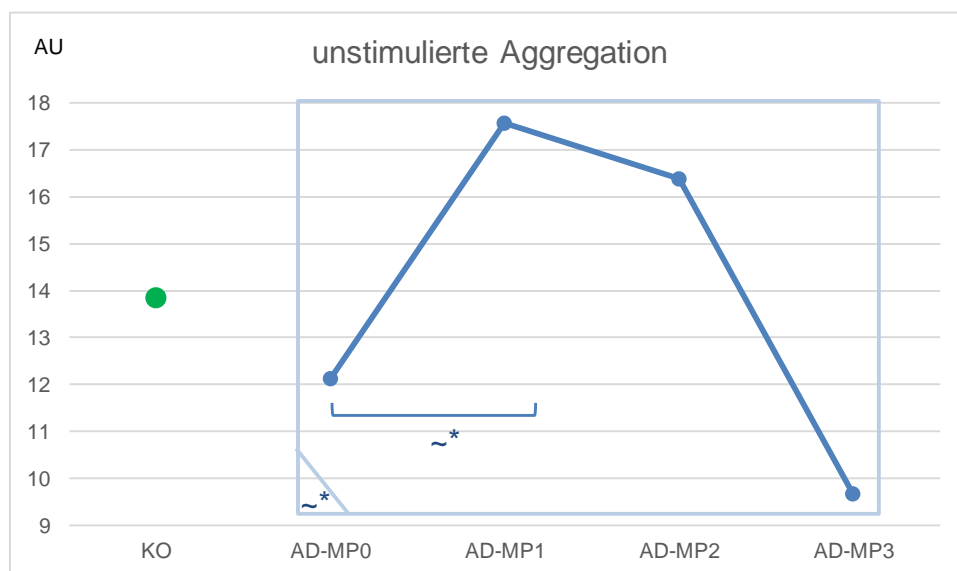


Abbildung 16 – Verlauf der AuC-Mittelwerte der unstimulierten Thrombozytenaggregation.

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; AuC, Area under the Curve in Aggregations-Einheiten (AU); ~* 0,05<p<0,1 Blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

Stimulation der Thrombozyten mit Arachidonsäure

Unter Stimulation mit Arachidonsäure sank die Aggregation der Thrombozyten (repräsentiert durch die Fläche unter der Aggregationskurve) im Verlauf unter AChE-I-Therapie ab, schwankte aber um einen Anstieg der Aggregation zwischen Messzeitpunkt 0 und 2 (Post-hoc Tukey-Kramer: $p=0,0259$), woraufhin ein Abfall der

Aggregation zwischen Zeitpunkt 2 und 3 folgte (Post-hoc Tukey-Kramer: $p=0,0963$). Die Veränderung innerhalb der Verlaufsmessungen war im gemischten Modell signifikant mit $p=0,0170$ (Abbildung 17). Auch unter Einbezug der gesunden Kontrollen verhielt sich das gemischte Modell zwischen allen Gruppen verschieden ($p=0,0187$). Im T-Test war die Aggregation bei Stimulation mit AA der Kontrollen signifikant höher als bei AD-MP3 (AA-RUO: $p=0,046$), für den Vergleich zwischen AD-MP0 und KO zeigt sich ein Trend in dieselbe Richtung (AA-AuC: $p=0,057$) (siehe Abbildung 17).

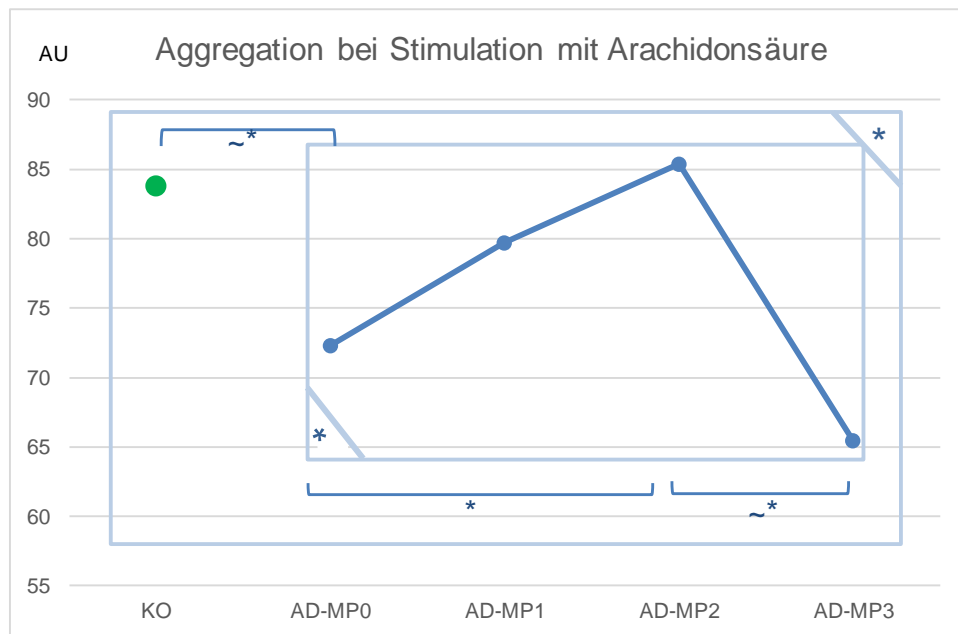


Abbildung 17 – Verlauf der AuC-Mittelwerte bei Arachidonsäure-stimulierter Thrombozytenaggregation

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; AuC, Area under the Curve in Aggregations-Einheiten (AU); * signifikant mit $p<0,05$; ~* $0,05<p<0,1$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell.

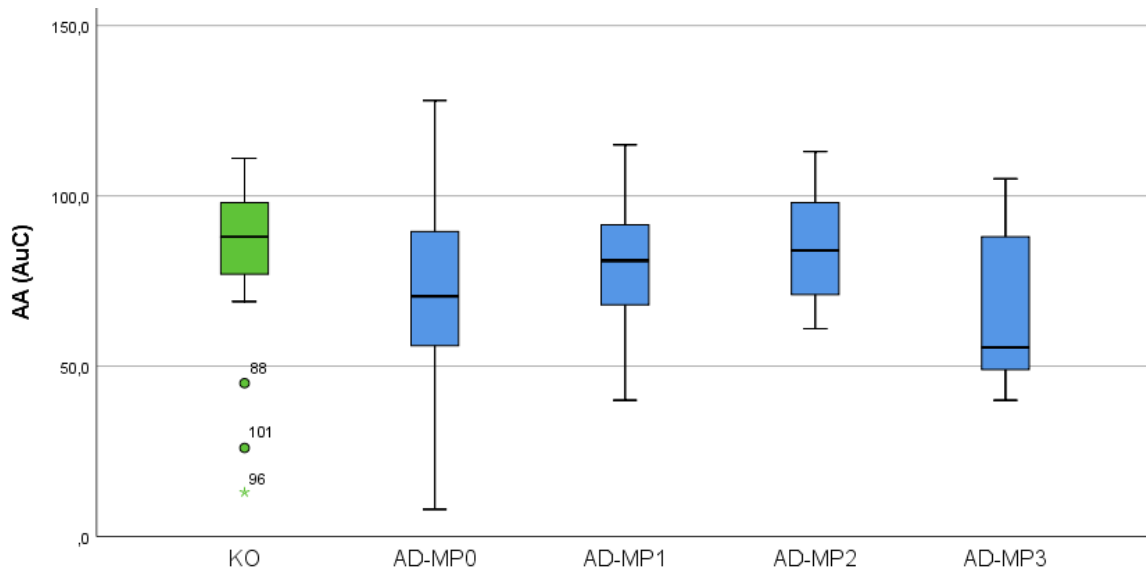


Abbildung 18 – Aggregation im Multiplate nach Stimulation der Thrombozyten mit Arachidonsäure

AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt; AA, Arachidonsäure; AuC= Area under the Curve in Aggregationseinheiten; Signifikanzen siehe Abbildung 17

Abbildung 19 zeigt die Boxplots mit Mittelwerten und Quartilen im Verlauf der einzelnen Messzeitpunkte. Dabei ist auffällig, dass schon bei unbehandelten Patienten ein im Trend niedrigerer Mittelwert ($p=0,057$) in der Aggregation durch Stimulation mit Arachidonsäure besteht. Dieser nähert sich über die beiden weiteren Messzeitpunkte (AD-MP1 und AD-MP2) dem Mittelwert der Kontrollgruppe an. Mit der höchsten kumulierten Dosis, in der Gruppe zum Messpunkt 4, sinkt die Aggregation im Mittel wieder ab ($p=0,096$).

Stimulation der Thrombozyten mit ADP

Die Aggregation im Multiplate unter Stimulation mit ADP war bei AD-Patienten im unbehandelten Zustand geringer als bei gesunden Kontrollen ($p=0,047$), danach stiegen die Mittelwerte bis zum MP2 auf das Niveau der gesunden Kontrollen an und fielen zum letzten Messzeitpunkt wieder ab (AD-MP3 vs. KO: $p=0,054$) (Abbildung 19). Der Verlauf zeigte sich insgesamt sehr ähnlich zum Verlauf unter Arachidonsäure-Stimulation. Unter Einbezug der Kontrollen ließ sich ein Unterschied im gemischten Modell innerhalb aller Gruppen nachweisen ($p=0,0139$). Auch im Modell, das zwischen den Verlaufsmessungen der Patienten unterscheidet, zeigte sich ein signifikanter

Unterschied der Gruppen ($p=0,0114$). Hier unterschieden sich post-hoc im Tukey-Kramer Test die unbehandelten AD-Patienten von AD-MP1 im Trend ($p=0,1228$) und signifikant zu AD-MP2 ($p=0,0338$). Auch die Gruppe AD-MP2 wies auf einen Unterschied zu AD-MP3 hin ($p=0,0864$).

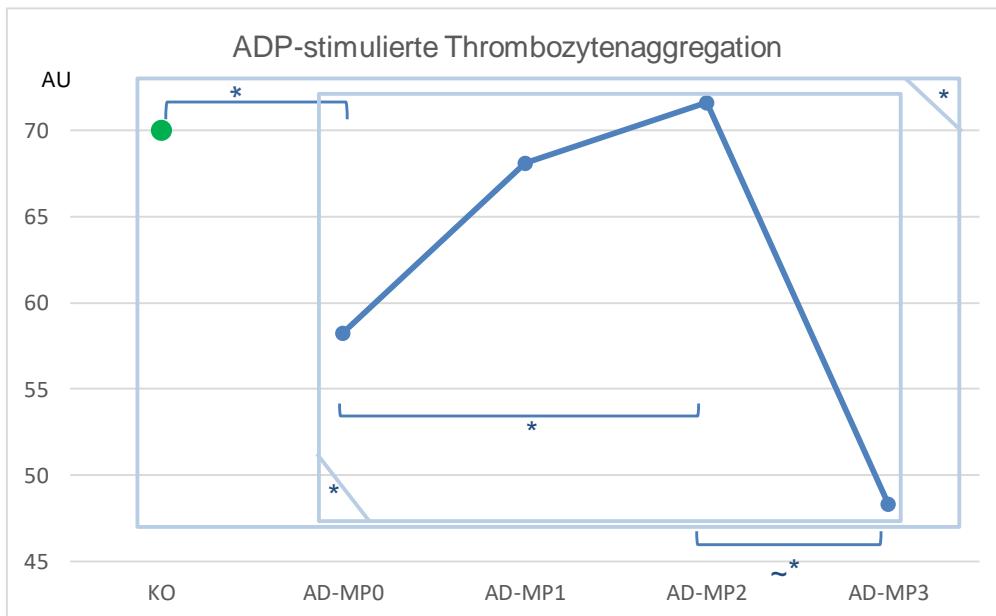


Abbildung 19 – Verlauf der AuC-Mittelwerte bei ADP-stimulierter Thrombozytenaggregation.

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; AuC, Area under the Curve in Aggregations-Einheiten (AU); *signifikant mit $p<0,05$; ~* $0,05<p<0,1$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

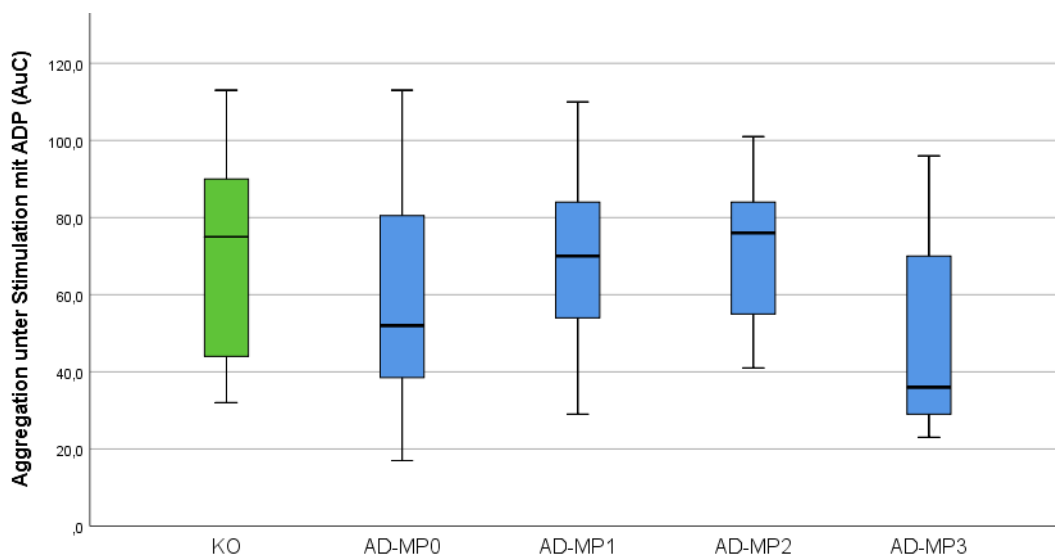


Abbildung 20 – Aggregation im Multiplate nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP

AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt; AuC, Area under the Curve in Aggregationseinheiten (AU); Signifikanzen siehe Abbildung 17

Stimulation mit dem Thromboxan-Rezeptor-Analagon U46619

Unter Stimulation mit U46619 ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Thrombozytenaggregation über den Therapieverlauf. Auch der Vergleich der einzelnen Verlaufsmessungen mit der Kontrollgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede.

3.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede der Thrombozytenaggregation

In der unstimulierten Aggregation zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen (Abbildung 21): Im gemischten Modell, was sowohl Kontrollen, als auch alle AD-Verläufe mit einbezieht, zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit dem fixen Effekt Geschlecht und Verlauf ($p=0,0056$). Auch allein innerhalb der Verlaufsgruppen zeigte sich für den Effekt „Geschlecht“ ein Unterschied zwischen dem Merkmal der unstimulierten Aggregation ($p=0,0157$), für die Effekte Verlauf und Geschlecht ergibt sich lediglich ein Trend ($p=0,148$). Der Anstieg der unstimulierten Aggregation bei männlichen AD-Patienten von MP0 zu MP1 ($p=0,0199$), sowie der Unterschied in der unstimulierten Aggregation weiblicher AD-Patienten zu MP0 und MP1 verglichen mit der erhöhten Aggregation der männlichen AD-Patienten zu MP1 zeigte sich im Tukey-Kramer post-hoc Test signifikant ($p=0,0006$ bzw. $p=0,0096$). Für die Aggregation unter Stimulation mit AA, ADP und U46619 ergeben sich keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen im gemischten Modell.

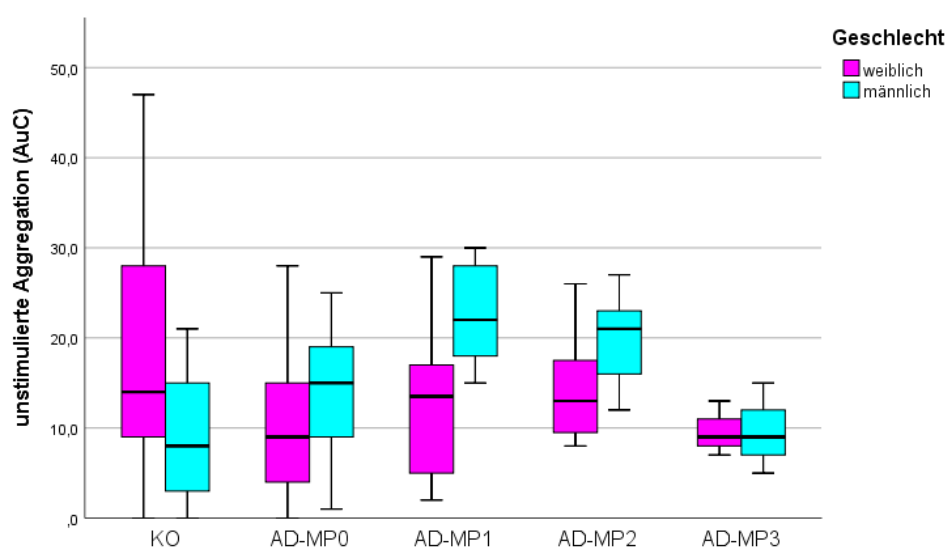


Abbildung 21 – Unstimulierte Thrombozytenaggregation getrennt nach Geschlecht
AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; AuC, Area under the Curve in Aggregations-Einheiten (AU)

3.3 Thrombozytendegranulation

3.3.1 Unbehandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen

Die Plättchendegranulation wurde mit den klassischen Plättchenagonisten ADP (5 μ M) und U46619 (5 μ M) induziert und über die Oberflächenexpression von P-Selektin (CD62P) und LAMP3 (CD63) als Marker für Degranulation von alpha- bzw. Dichtegranula detektiert. Die Oberflächenexpression von P-Selektin durch Stimulation mit ADP und U46619 zeigte sich bei unbehandelten AD-Patienten signifikant erniedrigt im Vergleich zu KO (CD62P: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) M1 183,5 \pm 49,4 versus 212,2 \pm 55,4; $p=0,024$ für die Aktivierung mit ADP und MFI M1 309,5 \pm 134,3 versus 382,1 \pm 112,0; $p= 0,024$ für die Aktivierung mit U46619). Auch die CD63-Expression nach Stimulation mit U46619 (MFI M1 243,1 \pm 119,7 versus 289,6 \pm 79,2; $p=0,034$) war signifikant niedriger bei unbehandelten AD-Patienten als bei gesunden Kontrollen (Tabelle 14).

Tabelle 14 – Thrombozytendegranulation im Verlauf der AChE-I Therapie bei Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen mit und ohne Plättchenstimulation.

	KO	AD-MP0	AD-MP1	AD-MP2	AD-MP3
Degranulationsmarker Alpha- Granula (CD62P)					
unstim	57,8 \pm 11,9	53,1 \pm 13,3	52,3 \pm 11,5	50,5 \pm 12,0	49,5 \pm 10,2
ADP	212,2 \pm 55,4	183,5 \pm 49,4	190,0 \pm 54,8	163,7 \pm 37,3	152,6 \pm 51,1
U46619	382,1 \pm 112,0	309,5 \pm 124,3	334,7 \pm 140,8	238,8 \pm 93,8	224,5 \pm 166,7
Degranulationsmarker Dichte-Granula (CD63)					
unstim	49,0 \pm 8,0	46,0 \pm 12,0	44,8 \pm 9,9	45,4 \pm 9,7	44,7 \pm 9,1
ADP	142,5 \pm 45,8	129,5 \pm 34,1	133,2 \pm 50,9	126,4 \pm 33,6	135,6 \pm 48,5
U46619	289,6 \pm 97,2	243,1 \pm 119,7	230,3 \pm 133,8	221,3 \pm 102,8	201,9 \pm 113,6

Alle Werte in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI); unstim, unstimuliert; ADP, Thrombozyten stimuliert mit Adenosindiphosphat; U46619, Thrombozyten stimuliert mit Thromboxananalogon U46619; AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt

3.3.2 Behandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen

Expression von CD62P

Die CD62P-Expression unstimulierter Thrombozyten sank im Verlauf der AChE-I Therapie ab. Nach einem Monat Therapie war die Degranulation bereits im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt (AD-MP1: $52,3 \pm 11,5$ vs. KO: $57,8 \pm 11,9$; $p=0,033$). Im Vergleich der Kontrollen zur Verlaufsgruppe AD-MP2 zeigte sich ein Trend in dieselbe Richtung (AD-MP2: $50,5 \pm 12,0$; $p=0,061$) (Abbildung 22). Im Vergleich der Kontrollgruppe zu den verschiedenen Messzeitpunkten war die CD62P-Expression unter ADP-Stimulation nach drei bzw. sechs Monaten AChE-I Einnahme signifikant niedriger ($p=0,007$, $p=0,036$), im Vergleich zu MP1 zeigte sich ein Trend ($p=0,062$) (Abbildung 23).

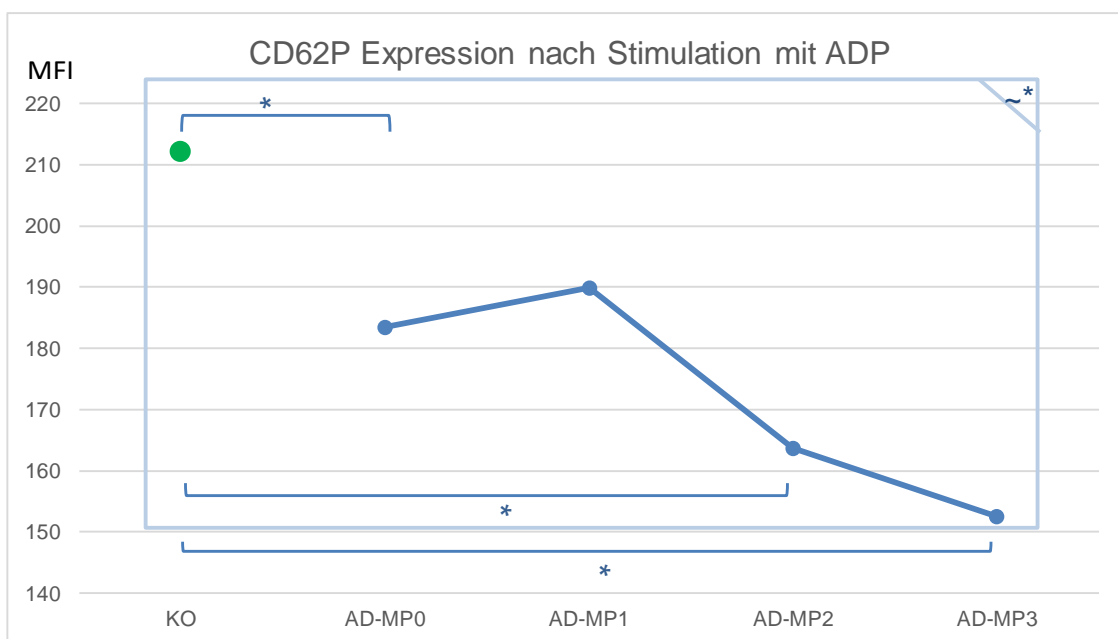


Abbildung 22 – Mittelwerte der CD62P-Expression nach Stimulation mit ADP in der durchflusszytometrischen Untersuchung.

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; *signifikant mit $p<0,05$; ~* $0,05<p<0,1$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

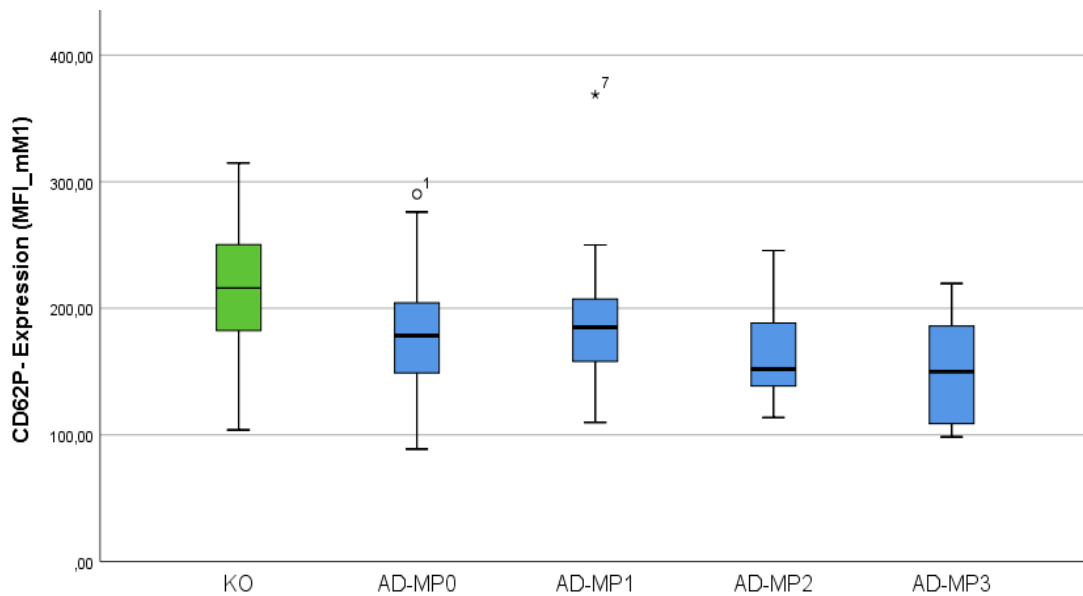


Abbildung 23 – Entwicklung der CD62P-Expression nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP

AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; mM1, Mittelwert des eingegrenzten Bereichs (M1); Signifikanzen siehe Abbildung 17

Unter Stimulation mit U46619 zeigte sich eine signifikante Verringerung der CD62P-Expression nach drei Monaten ($238,81 \pm 93,75$) und sechs Monaten Therapie ($224,5 \pm 166,7$) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($382,1 \pm 112,0$; $p < 0,0001$ bzw. $p = 0,012$). Im gemischten Modell lässt der Vergleich aller AD-Verläufe einen Unterschied der Gruppen vermuten ($p = 0,0748$). Dabei war in der post-hoc Analyse der Vergleich von AD-MP1 mit AD-MP2 ($p = 0,0262$ adjustiert nach Tukey-Kramer) und AD-MP1 mit AD-MP3 ($p = 0,0516$ adjustiert nach Tukey-Kramer) signifikant bzw. im Trend erniedrigt (Abbildung 24). Der stetige Abwärtstrend erwies sich auch im gemischten Modell, das alle Gruppen mit einbezieht (KO, AD-MP0, AD-MP1, AD-MP2, AD-MP3), als signifikant ($p = 0,0134$).

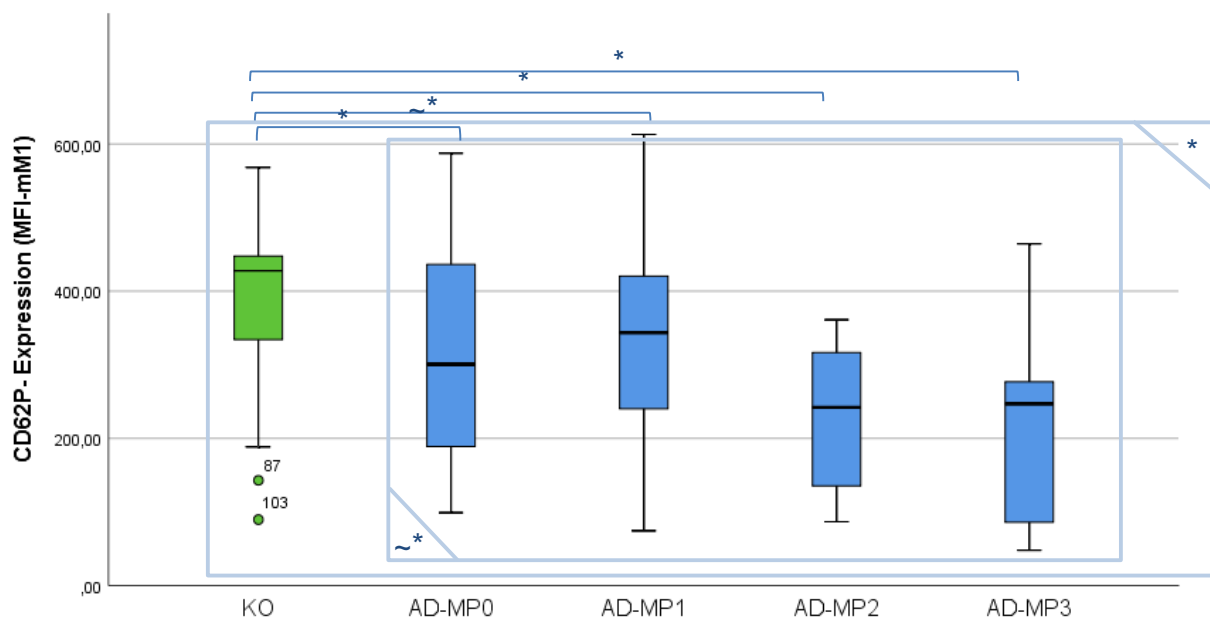


Abbildung 24 – U46619 induzierte Thrombozyten-Degranulation

U46619 induzierte Degranulation gemessen anhand der CD62P-Expression im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie. AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; MFI, mittlere Fluoreszenzintensität; mM1, Mittelwert des eingegrenzten Bereichs (M1); *signifikant mit $p < 0,05$; ~* $0,05 < p < 0,1$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

Auch die relative Aktivierung (CD62P-Expression unter Stimulation/CD62P-Expression unstimuliert) war unter Stimulation mit U46619 im Trend im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt ($6,6 \pm 2,7$ vs. $4,9 \pm 2,2$; $p = 0,052$).

Expression von CD63

Im unstimulierten Zustand ist die CD63-Expression zu MP0, MP1 und MP2 im Trend niedriger, als bei gesunden Kontrollen ($p = 0,083$) (Tabelle 14). Die CD63- Expression nach Stimulation mit U46619 zeigte sich bei unbehandelten AD-Patienten im Trend erniedrigt im Vergleich zu gesunden Kontrollen ($45,96 \pm 12,03$ vs. $49,00 \pm 8,04$, $p = 0,078$). Im Therapieverlauf war die niedrigere Expression im Mittelwert im Trend konstant (KO vs. AD-MP1: $p = 0,05$, KO vs. AD-MP2: $p = 0,083$). Nur in der Stimulation der Thrombozyten mit U46619 unterschieden sich die Gruppen AD-MP0 ($p = 0,034$) signifikant, sowie AD-MP1 ($p = 0,085$), AD-MP2 ($p = 0,078$) und AD-MP3 ($p = 0,069$) im

Trend von den gesunden Kontrollen (Tabelle 14). Bei Stimulation der Plättchen mit ADP zeigten sich keine Signifikanzen im CD63-Expressionsniveau.

3.4 Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors

Die Plättchenaktivierung (unstimuliert, aber auch unter Stimulation mit ADP und U46619) wurde durchflusszytometrisch über die Detektion des aktivierten Fibrinogenrezeptors (aktivierter Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex) auf der Thrombozytenoberfläche mittels Pac-1 Antikörper gemessen. Unter Stimulation mit 100 μM ADP zeigten sich zu MP1 und MP2 signifikant höhere Expressionsraten als bei gesunden Kontrollen (KO: $212,5 \pm 140,6$ MFI vs. AD-MP1: $326,0 \pm 177,3$; $p=0,041$, AD-MP2: $360,1 \pm 125,2$; $p=0,006$), im Vergleich zu AD-MP0 ergab sich ein Trend ($298,1 \pm 165,1$; $p=0,081$). Auch die relative Aktivierung (Expression unter ADP-Stimulation/ unstimulierte Expression) war bei unbehandelten AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ($8,1 \pm 4,1$ vs. $10,3 \pm 2,9$; $p=0,036$). Allerdings wurde im ungefärbten und unstimulierten Zustand bereits eine höhere MFI gemessen (KO: $3,0 \pm 0,8$ vs. AD-MP0: $3,3 \pm 0,7$; $p=0,094$ und AD-MP1: $3,4 \pm 0,8$, $p=0,030$).

Bei der Berechnung der gemischten Modelle aller Verlaufsgruppen untereinander und auch unter Einbeziehung der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der durchflusszytometrischen Pac1-Messung, sowohl in den absoluten Messwerten, als auch in den relativen Werten.

3.5 Blutbild von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

3.5.1 Thrombozytenzahl und -indizes

Die Plättchenanzahl zeigte sich bei AD-MP0-Patienten signifikant verringert im Vergleich zu KO mit einer Plättchenanzahl von $232,5 \pm 58,7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ verglichen mit $255,3 \pm 59,7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ in KO ($p=0,029$). Dabei wies der Verlauf eine deutliche Ähnlichkeit zum Verlauf der Thrombozytenaggregation auf (Abbildung 25). Ein Unterschied der Verlaufsgruppen konnte im gemischten Modell mit $p=0,0374$ nachgewiesen werden. Hier fiel vor allem der Anstieg von AD-MP0 zu AD-MP1 ins Gewicht ($232,5 \pm 58,7 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ vs. $248,3 \pm 64,2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$; post-hoc Tukey-Kramer: $p=0,045$). Auch unter Einbezug der gesunden Kontrollen zeigte das gemischte Modell einen signifikanten Unterschied aller Gruppen ($p=0,0451$).

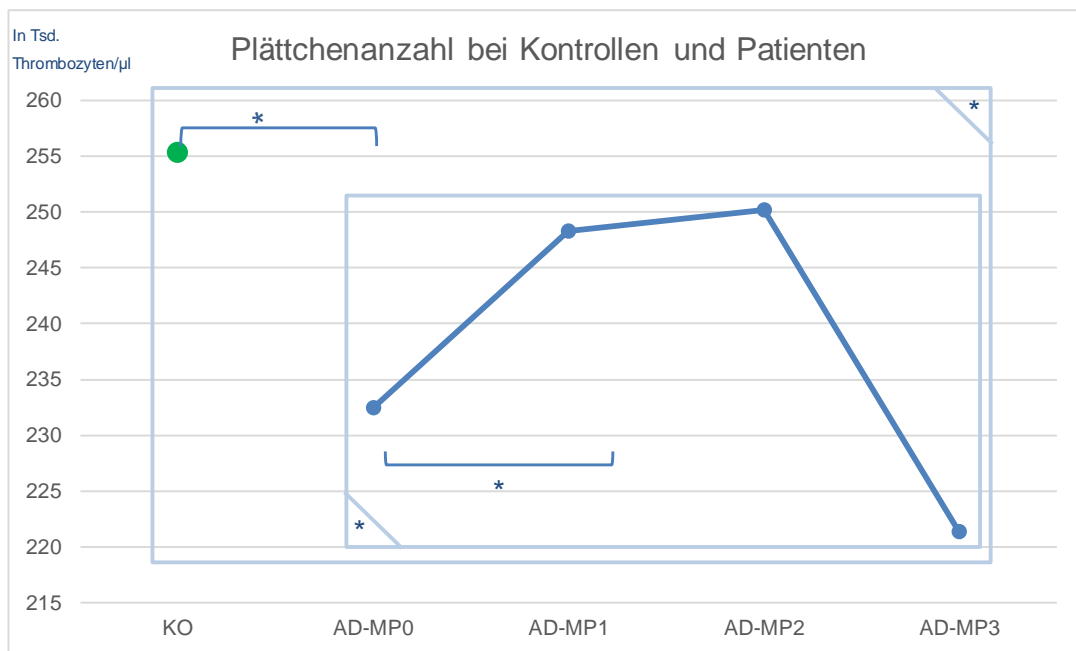


Abbildung 25 – Mittelwerte der Thrombozytenzahl bei Kontrollen und Patienten

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; *signifikant mit $p < 0,05$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

Der Thrombokrit war ebenfalls mit $0,19 \pm 0,05$ bei AD Patienten niedriger als bei gesunden Kontrollen ($p=0,020$) (Tabelle 15).

Tabelle 15 – Thrombozytenkennzahlen im Verlauf der AChE-I Therapie bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

	KO	AD-MP 0	AD-MP 1	AD-MP 2	AD-MP 3
Plt in $10^3/\mu\text{l}$	$255,3 \pm 59,7$	$232,5 \pm 58,7$	$248,3 \pm 64,2$	$250,1 \pm 83,1$	$221,3 \pm 48,5$
Thrombokrit	$0,21 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,03$

AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt; Plt, Thrombozyten

3.5.2 Erythrozytenkennzahlen und Hämoglobin

Hämoglobin

Der Hämoglobin-Wert der Patienten hatte im Zeitverlauf eine steigende Tendenz, die Hb-Werte unterschieden sich in den Verlaufgruppen signifikant untereinander

($p=0,0062$ im fixed-effects-Model), unterlagen allerdings im Zeitverlauf Schwankungen (Tabelle 16). Dieser Effekt ließ sich post-hoc im Tukey-Kramer Test zurückführen auf die Unterschiede der Messzeitpunkte 0 ($p=0,01$), 1 ($p=0,0031$) und 2 ($p=0,0149$) im Vergleich mit dem Messzeitpunkt 3.

Tabelle 16 – Hämoglobinwert und Erythrozytenkennzahlen im Verlauf der AChE-I Therapie bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

	KO	AD-MP 0	AD-MP 1	AD-MP 2	AD-MP 3
Hb in g/dL	14,24 ± 1,15	14,21 ± 1,20	14,08 ± 1,26	14,31 ± 1,41	15,18 ± 2,31
MCV in fl	92,02 ± 2,98	91,00 ± 3,16	91,20 ± 3,38	90,76 ± 3,16	91,0 ± 3,16
MCH in pg	31,19 ± 1,08	30,75 ± 1,35	30,59 ± 1,30	31,05 ± 2,41	32,35 ± 3,90
MCHC in g/L	33,91 ± 0,77	33,77 ± 0,64	33,54 ± 0,63	34,20 ± 2,21	36,55 ± 4,19

AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt; Hb, Hämoglobin; MCV, mittleres korpuskuläres Volumen; MCH, mittleres korpuskuläres Hämoglobin; MCHC, mittlere korpuskulare Hämoglobinkonzentration

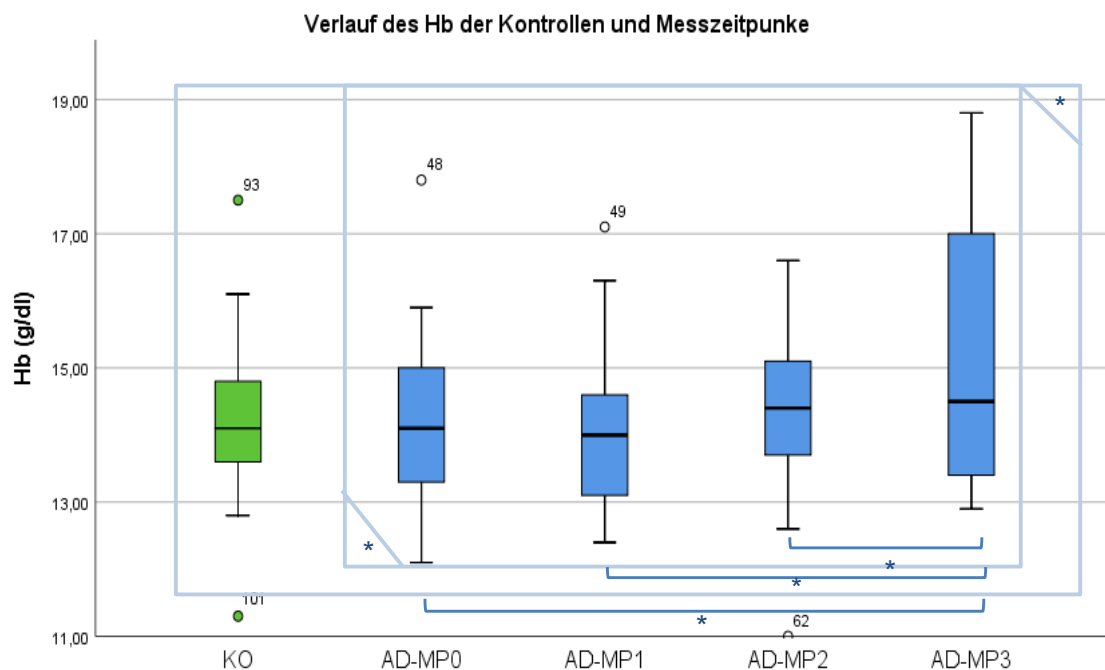


Abbildung 26 – Hämoglobin im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen;
*signifikant mit $p < 0,05$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

Auch im Vergleich der Gruppenverläufe unter Berücksichtigung der Kontrollgruppe zeigte sich ein Unterschied der Gruppen ($p=0,0129$), der besonders durch den Unterschied der Kontrollgruppe mit AD-MP3 begründet war (post-hoc Dunnett-Hsu: $p=0,0302$) (Abbildung 26).

Erythrozytenindizes

Das mittlere korpuskulare Volumen (MCV) wies in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von $92,02 \pm 2,98$ fl auf (Tabelle 16). Die MCVs der AD-Patienten waren im Mittelwert niedriger, mit im Zeitverlauf sinkender Tendenz. Dies zeigte sich nur im Vergleich von AD-MP3 zu den Kontrollen signifikant ($p=0,007$). Im gemischten Modell der AD-Verläufe und unter Einbezug der Kontrollen zeigte sich für diese Entwicklung keine Signifikanz.

Beim mittleren korpuskularen Hämoglobin (MCH) ergab sich eine signifikant steigende Entwicklung der MCH-Werte im Verlauf der Therapie ($p=0,0105$), die sich vor allem durch den Vergleich der Gruppen post-hoc im Tukey-Kramer Test bei AD-MP0 ($p=0,0101$), MP1 ($p=0,0066$) und MP2 (Trend: $p=0,0656$) mit der Gruppe 3 begründet lag (Abbildung 27). Auch im Vergleich aller Gruppen, inklusive der Kontrollgruppe, wies das gemischte Modell einen signifikanten Unterschied nach ($p=0,0113$), der durch den Unterschied der Kontrollgruppe und AD-MP3 hervortrat ($p=0,0476$).

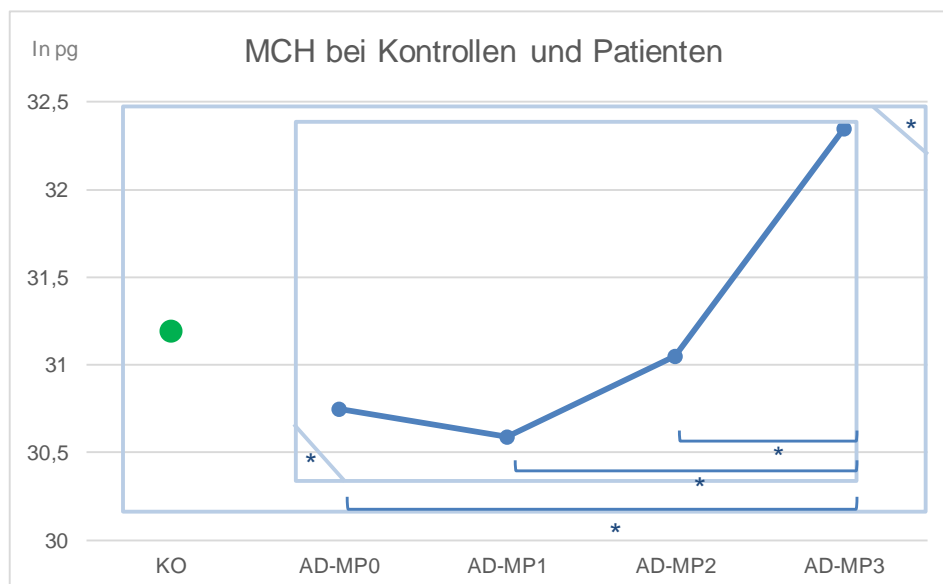


Abbildung 27 – MCH-Mittelwert im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; MCH, mittleres korpuskulares Hämoglobin in Pikogramm (pg); *signifikant mit $p<0,05$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

Die MCHC-Werte zeigten einen hochsignifikanten Anstieg über den Therapieverlauf ($p=0,0003$), der sich erneut post-hoc im Tukey-Kramer-Test vor allem über den Vergleich der Gruppen AD-MP0 ($p=0,0003$), MP1 ($p=0,0002$) und MP2 ($p=0,0062$) mit der Gruppe AD-MP3 ergibt. Auch der Unterschied aller AD-Patienten zu den gesunden Kontrollen ($p=0,0002$) war post-hoc vor allem durch den Unterschied zu AD-MP3 begründet ($p=0,0002$).

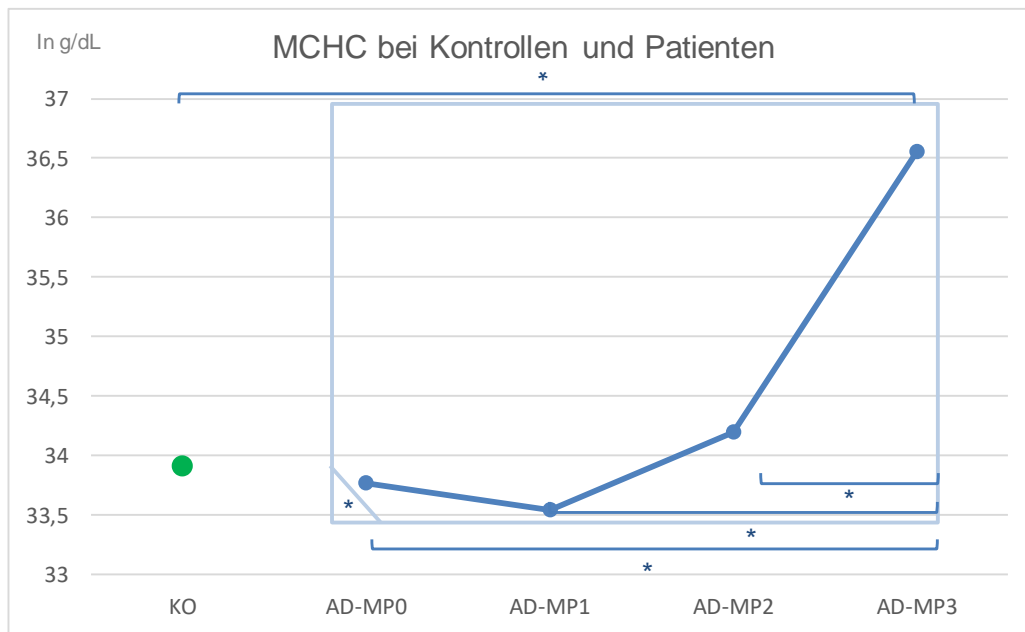


Abbildung 28 – MCHC-Mittelwert im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; MCHC, mittlere korpuskulare Hämoglobinkonzentration (g/dL); *signifikant mit $p<0,05$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

Leukozyten

Für die Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen und kein klarer Trend konnte erfasst werden. Im Differentialblutbild verhielt es sich genauso für die neutrophilen Granulozyten, sowie für die Monozyten. Für die basophilen Granulozyten zeichnete sich ein Trend im Therapieverlauf ab ($p=0,0947$); die Basophilenzahlen sanken anteilig an den WBC-Zahlen im Therapieverlauf mit einer Schwankung des Mittelwerts nach oben bei AD-MP1 ab. Dieser Abfall der Basophilenzahl zeigte sich im Trend nach post-hoc Testung mit Tukey-Kramer von AD-MP1 auf AD-MP3 ($p=0,0686$). Im direkten Vergleich der

Kontrollgruppe mit der AD-MP1 Gruppe waren die eosinophilen Granulozyten anteilig an der Gesamtleukozytenzahl signifikant erniedrigt ($2,43 \pm 1,34$ % vs. $1,50 \pm 1,08$ %; $p=0,011$). Im gemischten Modell bestätigte sich der signifikante Unterschied innerhalb der Gruppen nicht.

Für die Lymphozyten hingegen unterschieden sich die Gruppen im gemischten Modell, sowohl im Modell, das die gesunden Kontrollen mit einbezieht ($p=0,0399$), als auch beschränkt auf die Verlaufsguppen untereinander ($p=0,0208$). Post-hoc wurde dieser Effekt im Tukey-Kramer-Test durch den Vergleich der unbehandelten AD-Patienten (AD-MP0) mit der ersten (AD-MP1: $p=0,058$) und der zweiten (AD-MP2: $p=0,0375$) Verlaufsguppe bestätigt (Abbildung 29).

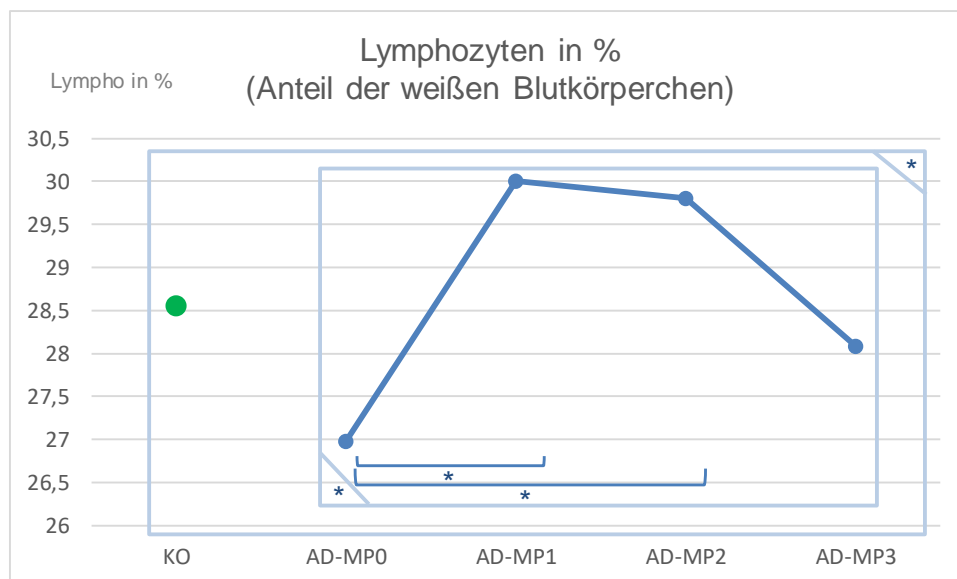


Abbildung 29 – Verlauf des Mittelwerts der Lymphozytenzahl

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; *signifikant mit $p<0,05$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell; Lympho, Lymphozyten in % anteilig an allen Leukozyten

3.5.3 Unterschiede im Blutbild zwischen männlichen und weiblichen Patienten

Um eine Untersuchung des Geschlechts auf die Entwicklung der Erythrozytenkennzahlen und des Hb vorzunehmen, wurde das gemischte Modell erneut, allerdings unter Beachtung des fixed effect Geschlecht und Verlauf gerechnet. Hierbei zeigte sich, dass der Anstieg des Hämoglobinwerts, des MCHs und MCHCs über den Therapieverlauf hinweg von der männlichen Fraktion der AD-Patienten bestimmt wird. Die Werte der AD-Patientinnen unterschieden sich im Therapieverlauf

nicht signifikant voneinander. Die Hb- Werte der Männer und Frauen unterschieden sich zu zwei Messzeitpunkten bei den AD-Patienten (AD-MP0: $p=0,0082$, AD-MP3: $p=0,0019$). Im Verlauf der Behandlung blieben die Hb-Werte der Frauen weitgehend konstant, wohingegen der Hb-Wert der männlichen AD-Patienten zunahm, sodass der Hb-Wert zu MP3 im Vergleich zu allen anderen MPs signifikant erhöht war (verglichen mit AD-MP0: $p=0,0023$, AD-MP1: $p=0,0008$, AD-MP2: $p=0,0054$) (Abbildung 30).

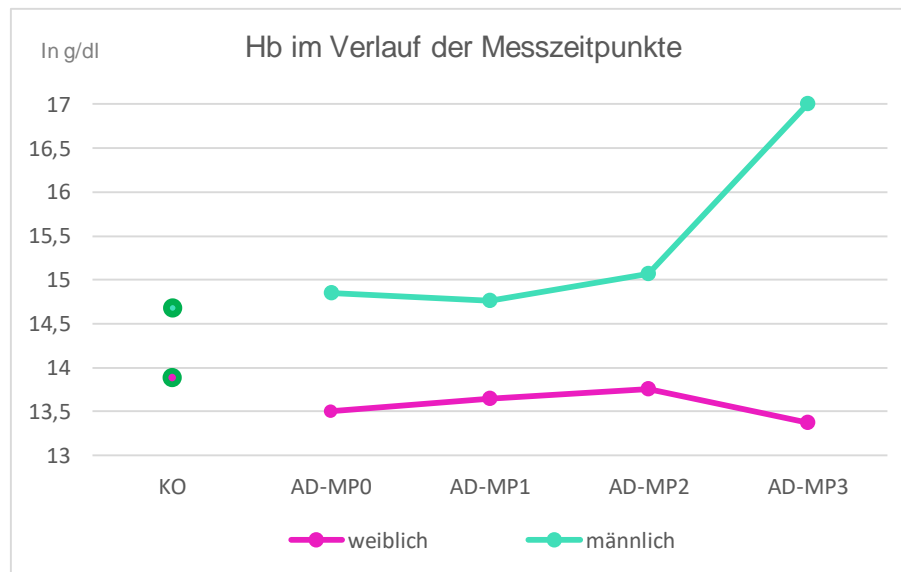


Abbildung 30 – Verlauf des Hb-Mittelwerts unter AChE-I Therapie bei männlichen und weiblichen Patienten und Kontrollen

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; Hb, Hämoglobin (g/dL)

Das MCHC veränderte sich im Therapieverlauf signifikant, zeigte sich aber auch zwischen den Geschlechtern signifikant verschieden ($p=0,0193$); ebenso unter Beachtung von Geschlecht und Verlauf ($p=0,0007$). Dabei unterschieden sich die männlichen AD-Patienten zu AD-MP0, AD-MP1 und AD-MP2 signifikant zu AD-MP3 (jeweils $p<0,0001$). Bei den AD-Patientinnen fanden sich keine Unterschiede zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Allein zu AD-MP3 war das MCHC signifikant erniedrigt im Vergleich zu den männlichen Patienten ($p=0,0023$) (Abbildung 31).

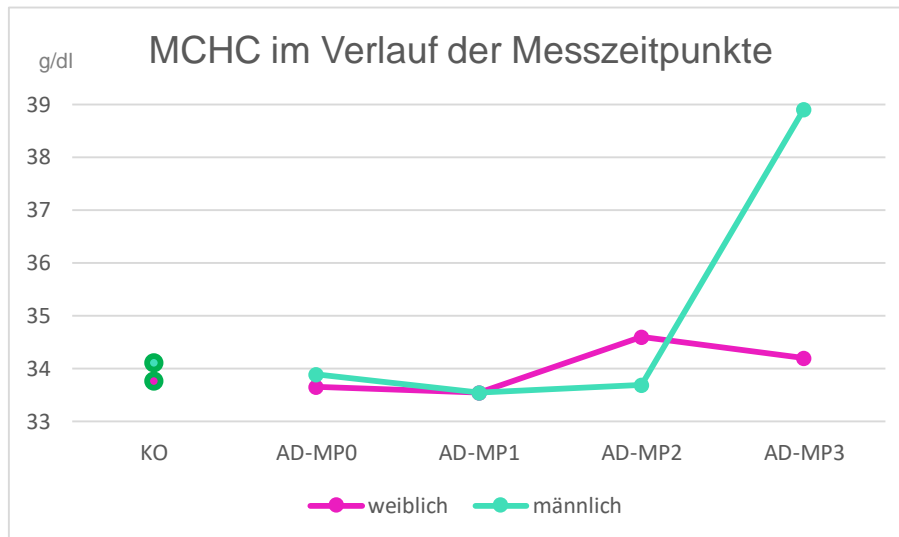


Abbildung 31 – Verlauf des MCHC-Mittelwerts unter AChE-I Therapie bei männlichen und weiblichen Patienten und Kontrollen

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; Hb, Hämoglobin (g/dL)

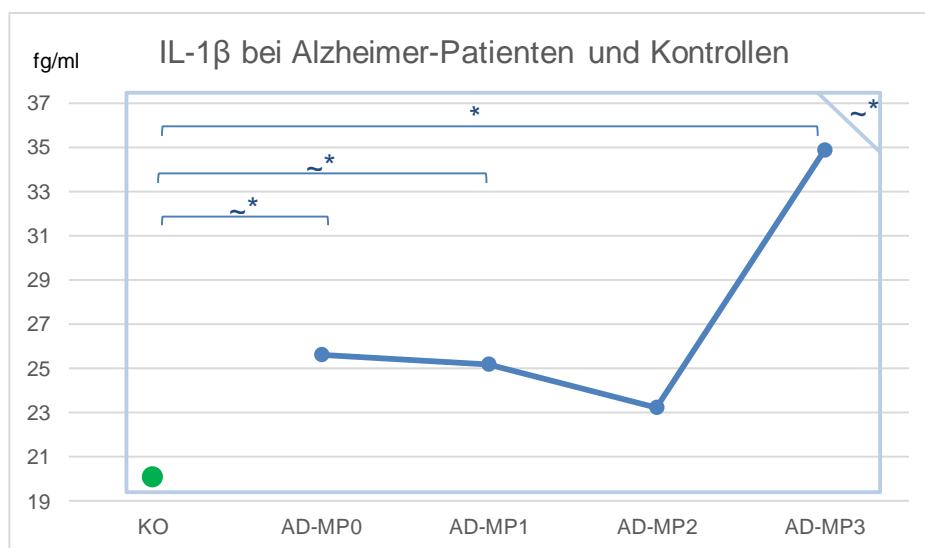
3.6 Inflammatorisches Niveau

Mittels hochsensitivem ELISA wurde der Interleukin 1 β (IL-1 β) Spiegel bestimmt. Im Vergleich zeigte sich, dass AD-Patienten einen höheren IL-1 β Spiegel aufwiesen als gesunde Kontrollen (Tabelle 17). Unter Einbezug der Kontrollen deutete das gemischte Modell auf einen Unterschied aller Gruppen hin ($p=0,0507$). Unter AChE-I Therapie stieg der IL-1 β Spiegel tendenziell weiter an. Zum Messpunkt AD-MP3 waren die mittleren IL-1 β Werte signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. ($20,09 \pm 6,91$ vs. $34,68 \pm 9,61$; $p=0,002$) (Abbildung 32, Abbildung 33). Für Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) fanden sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Verlaufsgruppen und auch im Vergleich zu gesunden Kontrollen, sowie in den gemischten Modellen.

Tabelle 17 – Vergleich Entzündungsparameter AD-U vs. KO

Parameter	Gruppe	N	Mittelwert in fg/ml ± Standardabweichung	T-Test	U-Test
IL-1 β	AD-U	40	25,60 ± 12,86	p=0,025	p=0,072
	KO	29	20,09 ± 6,91		
IL-6	AD-U	40	1828,61 ± 939,26	NS	NS
	KO	29	1704,07 ± 1017,30		
TNF α	AD-U	45	1971,38 ± 432,68	NS	NS
	KO	29	1915,00 ± 443,56		

AD, Alzheimer-Erkrankte; KO, Gesunde Kontrollen; MP, Messzeitpunkt; IL, Interleukin; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor; NS, nicht signifikant

Abbildung 32 – IL-1 β im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie

AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; IL, Interleukin; * signifikant mit $p < 0,05$; ~* $0,05 < p < 0,1$; blauer Kasten entspricht gemischtem Modell

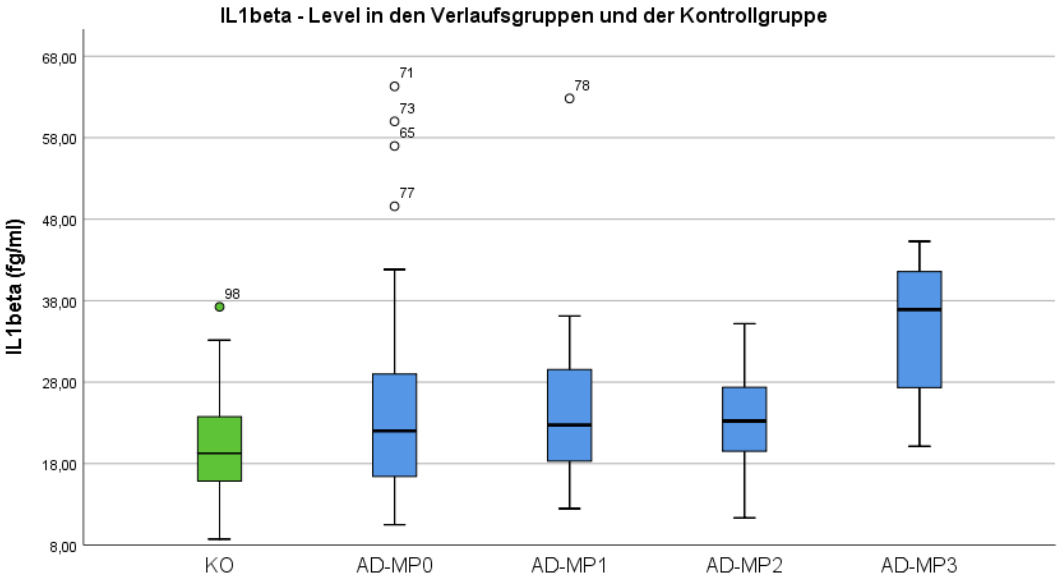


Abbildung 33 – Boxplot der IL-1 β Spiegel im Verlauf der AChE-I Therapie
AD, Alzheimer-Erkrankte; MP, Messzeitpunkt; KO, Gesunde Kontrollen; IL, Interleukin

4 DISKUSSION

In dieser Untersuchung wurde die Thrombozytenfunktion über die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation und -degranulation von Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen gemessen, sowie der Verlauf der Thrombozytenfunktion bei Alzheimer Patienten unter AChE-I Therapie untersucht. Erstmals wurden in dieser Untersuchung synchron sowohl Marker für die Thrombozytendegranulation- als auch -aktivierung und die Thrombozytenaggregation, sowie das periphere inflammatorische Niveau anhand typischer Zytokine an einem Alzheimer-Patientenkollektiv gemessen und mit gesunden Kontrollen verglichen. Die gesunden Kontrollen sind als Lebenspartner der AD-Patienten ähnlichen Umweltfaktoren ausgesetzt, was eine maximal mögliche Reduktion potenzieller Confounder erlaubte. Die Untersuchung soll so Aufschluss über den Unterschied der Thrombozytenfunktion zwischen unbehandelten AD-Patienten und gesunden Kontrollen, aber auch den Einfluss von AChE-I auf die Thrombozytenfunktion der AD-Patienten geben. In der Einleitung wurde bereits in die pathophysiologischen Interaktionen der neuronalen Veränderungen mit dem Immunsystem aber auch Zellen des peripheren Blutes eingeführt. Die in dieser Untersuchung erarbeiteten Ergebnisse sollen im Folgenden vor dem Hintergrund der eingeführten Erkenntnisse diskutiert und eingeordnet werden.

4.1 Einordnung der Studienpopulation

Die AD-Patienten unterschieden sich weder in Alter, Gewicht oder BMI von den gesunden Kontrollen. Entsprechend der bestehenden Diagnose der Alzheimer-Demenz unterscheiden sich die MMSE-Scores signifikant voneinander, was eine korrekte Zuordnung in die Kontroll- bzw. Krankheitsgruppe gewährleistet. Allerdings wurden die Kontrollprobanden im zeitlichen Verlauf nicht weiter neuropsychiatrisch untersucht, weswegen eine potenziell spätere Diagnose einer Alzheimer- oder anderen Demenzform nicht ausgeschlossen werden kann und damit auch prodromale Veränderungen in Thrombozytenfunktion und Blutbild nicht komplett ausgeschlossen werden können.

Nachdem die Leitlinie zur Behandlung der AD den verschiedenen AChE-I bei leichter bis mittelschwerer AD eine Gleichwertigkeit zuschreibt und sich die Behandlung „primär am Neben- und Wechselwirkungsprofil orientieren [soll]“ (Deutsche

Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), S3 Leitlinie Demenzen, 2016¹²⁴), wurde bei Anzeichen der Rivastigmin-Pflasterunverträglichkeit eine Umstellung des AChE-I auf ein anderes Präparat vorgenommen und diese Patienten von der Studie ausgeschlossen. Weitere Gründe für die hohe Drop-out Rate von 51% waren eine fehlende weitere Anbindung an das Zentralinstitut für seelische Gesundheit (ZI): Zur ausführlichen Diagnostik suchten die betagten Patienten das ZI auf, die Weiterbehandlung erfolgte teilweise bei örtlich besser erreichbaren Ärzten. Auch Begleitsymptome der AD, die einen Einsatz von selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (SSRI) erforderten, führten zum Ausschluss aus der Studie. Darüber hinaus wurde eine weitere Blutentnahme nicht durchgeführt, wenn anamnestisch der Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS) eingenommen wurde. Einerseits stellen die hohe Drop-out-Rate und die begrenzte Patientenzahl eine Limitation dieser Studie dar, andererseits ist ein umfassender Ansatz zur Untersuchung der Thrombozyten an betagten AD-Patienten möglicherweise gerade aus diesem Grund bisher nicht in dieser Form in der Literatur zu finden. Weitere Stärken der Studie sind der Vergleich aller Ergebnisse der AD-Patienten mit einer Kontrollgruppe, die durch Rekrutierung der Lebenspartner der Patienten hohe Ähnlichkeit in Alter und Umweltfaktoren hat. Darüber hinaus stellt diese Untersuchung erstmals Thrombozytenaggregation, -degranulation, Blutbild und inflammatorische Marker in einer longitudinalen Auswertung in einem AD-Kollektiv zusammen.

4.2 Thrombozytenaggregation und -degranulation

Einige Studien haben bereits die Thrombozytenfunktion von AD-Patienten oder Zusammenhänge zwischen AD und Thrombozyten untersucht. Dabei wurden oft selektiv einzelne Marker für Degranulation und/oder Aggregation, sowie Interaktionen mit AD-relevanten Proteinen untersucht. Die Ergebnisse sind bisher kontrovers, ebenso unterscheiden sich die Methodiken stark, sodass die Ergebnisse dadurch insgesamt wenig vergleichbar scheinen. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass unter AD-Patienten eine verringerte Plättchenaggregation und -degranulation, sowie ein erhöhtes inflammatorisches Niveau besteht. Im Verlauf der Behandlung mit AChE-I sinken Aggregation und Degranulation tendenziell ab. Zusätzlich zeigen sich Unterschiede in Erythrozyten- und Thrombozytenkennzahlen.

Einzelne Veränderungen lassen sich in erste Linie auf das männliche Geschlecht zurückführen. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden im Detail diskutiert werden.

4.2.1 Unbehandelte Alzheimer-Patienten vs. gesunde Kontrollen

Thrombozytenaggregation

Nach Stimulation mit AA und ADP aggregierten die Plättchen konsistent weniger bei unbehandelten AD Patienten als bei gesunden Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass eine Veränderung in den Thrombozyten der AD-Patienten zu einer Inhibierung bzw. verringerten Aktivierung der Thrombozyten nach Stimulation mit AA und ADP führt. Auch Rao et al. konnten zeigen, dass Thrombozyten von AD-Patienten auf die Stimulation mit Arachidonsäure im Vergleich zu gesunden Kontrollen in der Aggregometrie nur wenig reagierten, was die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstützt²¹³. Rao et al. verwendeten eine ähnliche Konzentration an AA wie die zugrunde liegende Untersuchung (0,45 vs. 0,5mM). Erst bei sehr hohen Konzentrationen AA (0,9mM) wurde eine normale Aggregation unter AD-Patienten beobachtet. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt durch Ko-stimulation mit Adrenalin aufheben, woraufhin die Thrombozyten wieder in gleichem Ausmaß wie die der gesunden Kontrollen aggregierten²¹³. Allerdings inkludierten sie freiwillige Probanden als Kontrollen in der Studie, die wesentlich jünger (zwischen 30 und 50 Jahren) waren, als die AD-Patienten (über 60 Jahre) und als die hier rekrutierten Kontrollprobanden. Da die Thrombozytenaktivierung in verschiedenen Altersstufen variiert²¹⁴, muss das bei der Einordnung der Ergebnisse beachtet werden. Jedoch scheinen Plättchen im Alter stärker zu aggregieren²¹⁴, was das Ergebnis von Rao et al. der verringerten Aggregation unter AA-Stimulation bei AD-Patienten noch zusätzlich stützt. In der Studie wurden außerdem Plättchen von gesunden Kontrollen mit Plättchen-armem Plasma von AD-Patienten suspendiert. Es zeigte sich eine Blockade der Thrombin-Aktivierung, was einen Plättchen-inhibitorischen Faktor im Plasma der AD-Patienten vermuten lässt²¹³.

Für die Aggregation unter Stimulation mit ADP finden sich nur wenige Daten. Mildner et al. entdeckten, dass der ADP-Rezeptor P2Y₁₂, der auch auf Thrombozyten exprimiert ist, im ZNS von AD-Patienten bei Mikroglia reduziert exprimiert ist²¹⁵. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung auf die Thrombozyten übertragen und eine geringere Expression von P2Y₁₂ auf Plättchen würde dann zu verhältnismäßig

geringerer Aggregation nach Stimulation mit ADP führen. Für diese Theorie konnte allerdings keine Evidenz in der Literatur gefunden werden und weitere Untersuchungen der Expression des P2Y₁₂-Rezeptors auf Thrombozyten sind vonnöten, um diese Hypothese zu prüfen.

In der vorliegenden Studie zeigt die Aktivierung der Thrombozyten durch das Thromboxanrezeptor-Analogon U46619 keine signifikant veränderte Aggregation im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

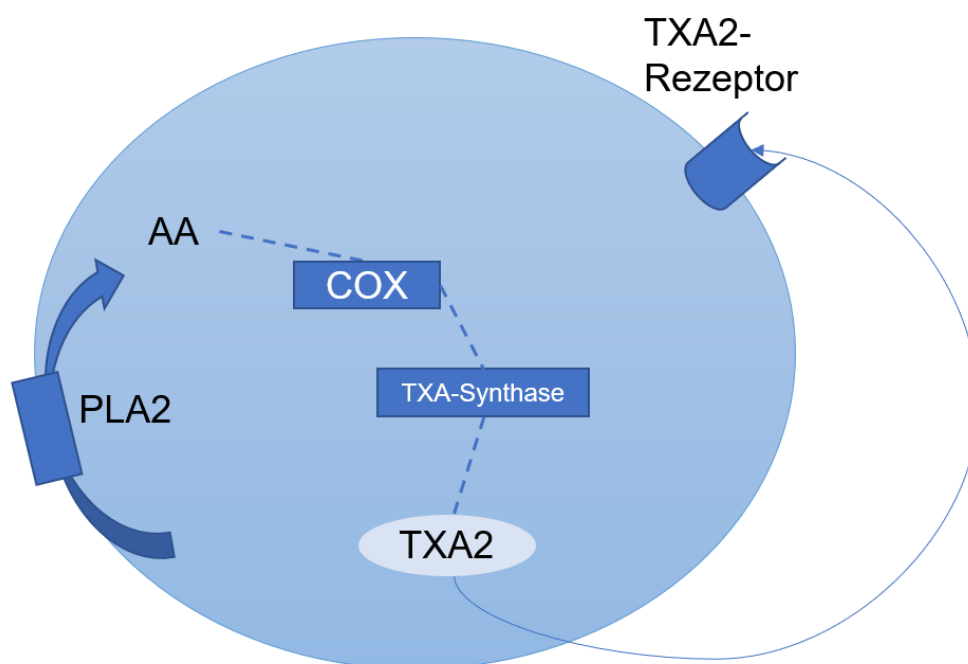


Abbildung 34 – Schematische Darstellung der Thromboxansynthese im Thrombozyten

Die Phospholipase A₂ (PLA₂) spaltet Arachidonsäure (AA) aus der Lipiddoppelschicht der thrombozytären Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Durch katalytische Prozesse der Cyclooxygenase 1 (COX) und Thromboxansynthase (TXA-Synthase) entsteht Thromboxan A₂ (TXA₂), was an den Thromboxanrezeptor binden und den Thrombozyten so aktivieren kann (vereinfachte Darstellung).

Da die Aktivierung unter Stimulation mit AA allerdings im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt ist deutet dies darauf hin, dass die Aktivierung der Thrombozyten über Thromboxan weitgehend normal ablaufen kann, wohingegen bei

AD-Patienten die Umwandlung von AA zu Thromboxan im Vergleich zu gesunden Kontrollen kompromittiert zu sein scheint (siehe Abbildung 34).

Zu dieser These passen Ergebnisse von Rao et al.: Es wurde die Freisetzung von AA aus aktivierten Plättchen gemessen, sowie die Umsetzung von AA in Thromboxan, wobei der inaktive Metabolit des TXA₂, TXB₂ gemessen wurde. Hierbei zeigte sich, dass bei AD-Patienten nur ca. die Hälfte der Menge an TXB₂ gemessen werden konnte, wie bei KO (25,1% vs. 12,6%), obwohl in beiden Gruppen kein ASS oder andere anti-inflammatorischen Medikamente innerhalb von 14 Tagen vor Blutentnahme eingenommen wurden²¹³. Einer verminderten Bildung von TXA₂ aus AA könnte entweder eine Veränderung der Cyclooxygenase (COX) oder der Thromboxansynthase zugrunde liegen. Es konnte keine Literatur zur Funktion der COX oder der Thromboxansynthase bei AD-Patienten gefunden werden, allerdings weisen Untersuchungen zum Auftreten vermehrter Mikro-Blutungsereignisse bei AD-Patienten unter Aspirin Therapie auf eine Fehlfunktion dieser Enzyme hin²¹⁶, auch wenn die Datenlage zu Mikroblutungen im Gehirn bei AD Patienten uneindeutig und spärlich vorhanden ist²¹⁷.

Auch das Vorkommen verschiedener APP-Formen nimmt Einfluss auf die Thrombozytenaggregation. APP als Vorläuferprotein des A β kommt in den alpha-Granula der Thrombozyten vor. Henry et al. konnten zeigen, dass APP, auch APP-Formen nach Spaltung durch α - und β -Sekretase, die Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP hemmen können²¹⁸. Dass sich die APP-Fragmente von AD-Patienten von denen gesunder Kontrollen unterscheiden wurde bereits mehrfach beschrieben; eine Reduktion der APP-Ratio (große APP-Fragmente/kleine APP-Fragmente) wurden sogar als diagnostisches Kriterium diskutiert^{38, 176, 219}. Eine aktuellere Studie von Marksteiner et al. konnte allerdings erhöhte sAPP β -Level bei AD-Patienten finden, wohingegen der sAPP α -Spiegel sich nicht von gesunden Kontrollen unterschied²²⁰. Darüber hinaus legen die Ergebnisse von Marksteiner et al. einen Effekt des sAPP auf die Arachidonsäurefreisetzung nahe. Eine Zugabe von zusätzlicher Arachidonsäure war in der Lage, den hemmenden Effekt nach ADP-Stimulation vollkommen aufzuheben. Möglicherweise sind in den Thrombozyten von AD-Patienten mehr sAPP-Moleküle vorhanden, die so inhibitorisch auf die Thrombozytenaggregation wirken. Die Zugabe von Arachidonsäure zur Stimulation der Thrombozyten in der vorliegenden Untersuchung reicht möglicherweise nicht aus, um den sAPP-Effekt vollkommen aufzuheben.

Henry et al. zeigten außerdem, dass sAPP-Formen keinen Einfluss auf die COX haben, sondern eher auf die Freisetzung von AA aus den Phospholipiden der Zellmembran²¹⁸. Diese Freisetzung wird durch die Phospholipase A2 (PLA2) katalysiert, der eine wesentliche Rolle in der Regulation von Immunantworten und der Neurotoxizität bei AD zugeschrieben wird²²¹. Zahlreiche Untersuchungen zeigen die Bedeutung der neuronalen PLA2 bei AD²²¹⁻²²⁵. Möglicherweise findet sich bei AD-Patienten nicht nur eine Herunterregulierung der neuronalen PLA2, sondern auch der thrombozytären PLA2, was die Theorie der verringerten AA-Freisetzung aus der Plättchenmembran und damit verringerten Aktivierung erklären könnte. Yang et al. fanden passend hierzu, dass eine Exposition verschiedener neuronaler Zellen mit PLA2 den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg des APP über eine Erhöhung der Membranfluidität begünstigt²²⁴. Ebenso war AA in der Lage, die Membranfluidität zu erhöhen und die Sekretion von sAPP α (nicht-amyloidogen) zu erhöhen²²⁴. Eine aktuelle Studie von Oberacher et al. bestimmte das Lipidom von Thrombozyten aus Alzheimer-Patienten und fand Alterationen, die zuvor nur im Gehirngewebe, Blutplasma und zerebrospinalen Fluid gefunden wurden²²⁶, was nahelegt, dass die Lipidzusammensetzung der Plättchenmembran und auch -Membranfluidität verändert sein könnten. Vor dem Hintergrund bestehender Literatur lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie so einen Zusammenhang zwischen veränderter Thrombozytenaggregation und veränderter thrombozytärer Membranfluidität vermuten. So könnten Erkenntnisse aus den 1980er und 90er Jahren in das Modell der thrombozytären Pathophysiologie bei AD-Patienten integriert werden.

Interessanterweise fanden Zubenko et al., dass die Membranfluidität der Plättchen von Alzheimer-Patienten mit dem Schweregrad der Demenz korreliert. AD-Patienten mit einer höheren thrombozytären Membranfluidität litten an einem früheren Auftreten der Demenz, aber auch einer schnelleren Verschlechterung und einem höheren Grad an Demenz²²⁷. Auch Kozubski et al. und Van Rensburg et al. zeigten damals, dass Thrombozyten von Alzheimer-Patienten eine erhöhte Membranfluidität aufwiesen²²⁸,
²²⁹.

Zusätzlich gibt es deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Amyloid- β und der Membranfluidität: Interessanterweise beeinflusst die Membranzusammensetzung die Akkumulation und Konformation von A β , aber auch umgekehrt hat A β einen Einfluss auf die Membranfluidität²³⁰. So scheint eine erhöhte Membranfluidität den nicht-amyloidogenen Spaltweg des APP zu begünstigen

und umgekehrt²³⁰. Peters et al. konnten zeigen, dass $A\beta_{1-40}$ über eine Verringerung der Membranfluidität und Komplexierung mit Gangliosiden die amyloidogene Spaltung von APP begünstigt. Das wiederum hält die $A\beta$ -Produktion aufrecht^{51, 231} (Abbildung 35).

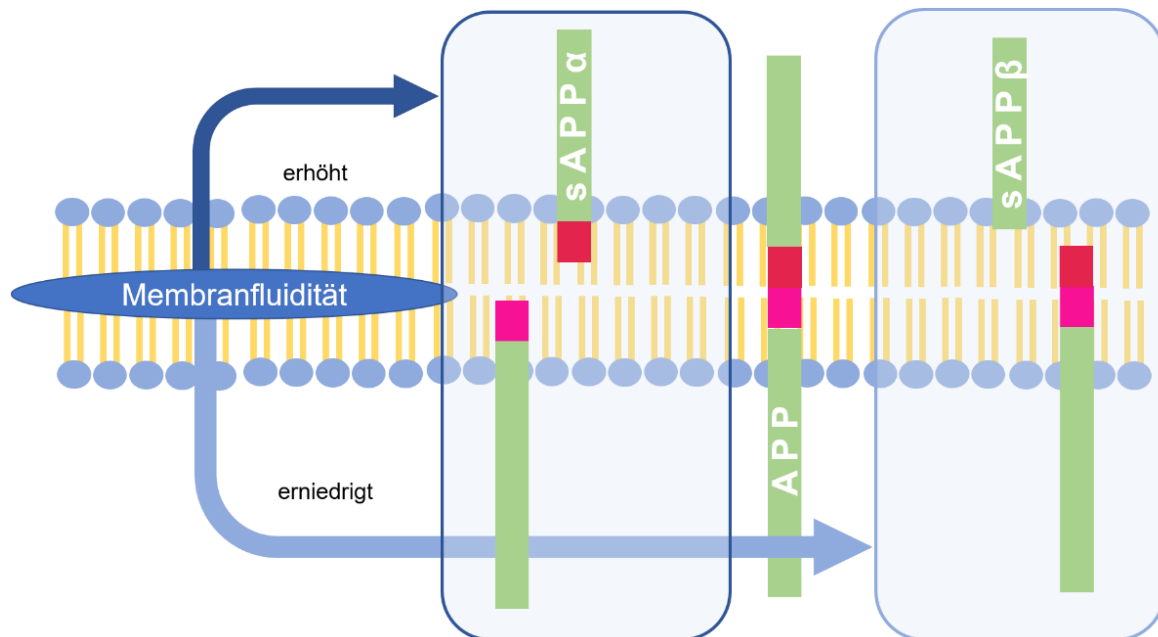


Abbildung 35 – Einfluss der Membranfluidität auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins

Bei erniedrigter Membranfluidität wird der amyloidogene Spaltweg des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) begünstigt. Bei erhöhter Membranfluidität wird die Bildung des sAPP α (nicht-amyloidogener Weg) begünstigt. Quelle: Eigene Grafik. Darstellung des APP angelehnt an Zhao et al.²³²

Während sich keine neueren Studien zur thrombozytären Membranfluidität finden, ist die Membranfluidität in neuronalen und anderen Körperzellen bei AD in den letzten Jahren vermehrt untersucht worden: Yasumoto et al. fanden, dass $A\beta_{1-42}$ in der Lage ist, durch reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxidation die Membranintegrität zu stören²³³. Dies hatte eine verringerte Membranfluidität und Calciumdysregulation zur Folge²³³. Dabei hatten $A\beta$ -Formen mit hohem Molekulargewicht wesentlich mehr schädigende Auswirkung, als $A\beta$ -Formen mit niedrigerem Molekulargewicht²³³. Diese Erkenntnisse legen einen Feedbackmechanismus des $A\beta$ nahe. Auch Khalifat et al. können diesen Einfluss des $A\beta$ auf die Membranfluidität bestätigen²³⁴. Über die

Einflüsse des A β auf die Zellmembran lässt sich möglicherweise neuronaler Zelluntergang durch A β -Oligomere erklären.

Interessanterweise erhöht vermehrte Einnahme ungesättigter Fettsäuren über die Nahrung die Membranfluidität und moduliert die Plättchenhyperaggregation, ebenfalls erniedrigt es auch die vaskuläre A β -Ablagerung und reduzierte die A β -Last im Gehirn²³⁵. Das unterstützt auch neuere Erkenntnisse zur AD-Therapie, in denen eine individuelle Einstellung metabolischer Parameter, auch der Ernährung, Erfolge in der AD-Therapie zeigen²³⁶. In einer Studie von Berlin et al. konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass die Plättchenaggregation nach Stimulation mit ADP direkt mit der Membranfluidität korreliert²³⁷. Die Ergebnisse der Studie legen eine erniedrigte Aggregation nach Stimulation mit ADP nahe, was möglicherweise dann auch mit einer erniedrigten Membranfluidität bei AD-Patienten einhergeht und sich damit nicht nur in die aktuelleren Ergebnisse zur Membranfluidität einfügt, sondern auch in die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Zusammenfassend entsteht der Bedarf für ausgedehntere Forschung auch am Lipidprofil und der Rolle der thrombozytären Membranen, um die peripheren pathophysiologischen Prozesse besser zu verstehen und potenzielle diagnostische Biomarker für AD zu entwickeln.

Auch Cholesterin, ein weiteres Lipid der Zellmembran, scheint einen maßgeblichen Einfluss auf das A β zu haben, während A β in vitro in neutraler Lösung hauptsächlich als alpha-Helix oder zufälliger Coil-Struktur vorkommt, wird es durch die Zugabe von Cholesterin aus Lipid-rafts neuronaler Rattenzellen in die β -Faltblattstruktur umgewandelt^{230, 238}. Diese Lipid-rafts scheinen die Hauptlokalisierung für die Interaktion von A β mit der Zellmembran zu sein^{230, 239-241}. Dabei erfolgt die Spaltung des APP durch die β -Sekretase hauptsächlich in Bereichen mit sogenannten Lipidrafts, Membranbereichen, die viel Cholesterin, Sphingolipide und gesättigte Phospholipide enthalten, wohingegen die Spaltung durch die α -Sekretase hauptsächlich in Bereichen ohne diese Lipidrafts erfolgt²⁴², was die Theorie zur Wichtigkeit der Zellmembran weiter stützt.

A β scheint darüber hinaus in der Lage zu sein, Poren in der Thrombozytenmembran zu induzieren, die permeabel für Ca²⁺ sind und so langsam, aber signifikant den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen können. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung und Degranulation²⁴³. Diese Erkenntnisse unterstützen die Theorie von Humpel et al., dass Plättchen eine initiiierende Rolle der AD-Pathologie im Hirn

spielen⁶. So könnte folglich eine hohe Dichte an A β im Gehirn zu lokaler Plättchenaktivierung und -degranulation und damit zur Bildung eines Thrombus führen, der mit A β zur CAA führt und durch die Obstruktion der Gefäße die Pathologie der AD noch verstärkt. Ob sich dieser Effekt allerdings auch durch die peripheren Veränderungen der A β -Level zeigt, da dieses vermutlich im peripheren Blut nicht auf ähnliche Weise akkumuliert, ist fraglich. Song et al. tragen in einer Meta-Analyse zusammen, dass die Plasma-A β Level bei manifester AD die von kognitiv normalen Kontrollen sogar unterschreiten, was eine Erklärung für die verringerte Aggregation in der vorliegenden Arbeit liefern könnte. Nicht nur über Poren in der Zellmembran, sondern auch über weitere intrazelluläre Signalwege scheint A β die Thrombozytenaktivierung zu verstärken: Herczenik et al. induzierten Proteinfehlfaltung und damit Amyloidbildung und fanden, dass diese Amyloide die Plättchenaktivierung über zwei Wege verstärken: Einmal über CD36 \rightarrow p38/MAPK \rightarrow TXA2 und über den intrazellulären Aktivierungsweg des GPIIb²⁴⁴.

Interessanterweise korreliert die Plättchenaggregation im Multiplate® mit der Thrombozytenzahl^{245, 246}, dies traf auch in der vorliegenden Arbeit zu. Eine verringerte Plättchenanzahl wiederum legt eine verringerte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten nahe. Um den Effekt der Thrombozytenzahl auf die verringerte Aggregation zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Thrombozytenzahl 20,3% der Varianz in der Aggregation von KO erklären kann, wohingegen bei AD-Patienten nur 8,9% der Aggregationsvarianz durch die Plättchenzahl erklärt werden kann. Daher kann zwar von einem Einfluss der Plättchenzahl auf die Aggregation ausgegangen werden, dies kann aber nur ein unwesentlicher Faktor in der verminderten Thrombozytenaggregation der AD-Patienten sein. Folglich wurde gezeigt, dass sich die Plättchenaggregation unabhängig von der Plättchenzahl in KO und AD-Patienten unterscheidet.

Thrombozytendegranulation und aktivierter Fibrinogenrezeptor

In dieser Doktorarbeit zeigte sich ein Trend zur erhöhten Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors über Bestimmung der Bindung an das Epitop des Glykoprotein IIb/IIIa Komplexes für Pac-1 unter Stimulation mit ADP ($p=0,092$) bei unbehandelten AD-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Dies deutet auf eine

Plättchenaktivierung hin. Auch in anderen Studien zeigte sich eine erhöhte Expression: Stellos et al. fanden darüber hinaus eine erhöhte Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors bei AD-Patienten mit schneller kognitiver Verschlechterung verglichen mit AD-Patienten, die unter langsamerer kognitiver Verschlechterung litten^{143, 247}. Der Vergleich von gesunden Kontrollen und AD-Patienten ergab allerdings bei diesen Autoren keinen signifikanten Unterschied. Interessanterweise fanden Donner et al., dass synthetisches A β mit hoher Affinität an den Fibrinogenrezeptor bindet, und so eine ADP- und Clusterinsekretion aus Thrombozyten bewirken kann, die eine Fibrinogenrezeptor-Aktivierung aufrechterhält. Das Clusterin ist als Chaperon in der Lage, A β fibrillär zu verändern. Außerdem sorgte A β auch für eine bessere Bindung von Fibrinogen an den Rezeptor²⁴⁸. Darüber hinaus zeigten Canobbio et al., dass A β über eine intrazelluläre Calcium-erhöhung eine ADP-Sekretion bewirkt²⁴³.

Nicht nur der Fibrinogenrezeptor, sondern auch das Fibrinogen scheint eine Rolle in der Pathophysiologie der AD zu spielen; so ist die Neurodegeneration in Modellen dann verstärkt, wenn auch Fibrinogen injiziert wird und umgekehrt reduziert bei Fibrinogendepletion^{249, 250}. Außerdem bindet A β nicht nur an den Fibrinogenrezeptor, sondern auch an Fibrin und bildet so vor dem Abbau geschützte Clots. Es fördert weiterhin die Bildung von Fibrin und die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine²⁵⁰. Dass Patienten, die an Thrombasthenie (syn. Glanzmann-Naegeli-Syndrom), einer genetische Alteration, die zu einem Defekt des GPIIb/IIIa- Rezeptors führt, weniger bzw. in bisher keiner Untersuchung gezeigt, an neurodegenerativen Erkrankungen leiden, bestätigt die Relevanz des Fibrinogenrezeptors für die AD²⁵¹.

Donner et al. begründen mit diesen Ergebnissen die Möglichkeit, dass Plättchen an der Formation der CAA direkt mitwirken und sich so die Angiopathie über stetige Plättchenaktivierung selbst aufrechterhält²⁴⁸. Die Aktivierung des Rezeptors über A β würde zwar die (im Trend) erhöhte Pac1-Expression der vorliegenden Untersuchung erklären, jedoch spiegelt sich diese potenzielle Erhöhung der Aktivierung nicht in der impedanzaggregometrischen Messung wider. Auch diesen Effekt konnten Donner et al. beobachten: Obwohl ADP die Clusterin-Freisetzung und die Bindung von A β und ADP verstärkte, wurde die Plättchenaggregation unter Zugabe von ADP und A β gemeinsam nicht verstärkt²⁴⁸. Offen bleibt in der Untersuchung von Donner et al., ob A β vorzugsweise an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet, oder ob es zufällig auch an die nicht-aktivierten Integrine selbst binden kann²⁴⁸. Daher bleibt auch ungeklärt, ob eine Bindung des A β die Aktivierung und Bindung des Fibrinogens

begünstigt, und damit eine Aktivierung begründet, oder ob eine Aktivierung primär vorhanden sein muss, um dann von A β verstärkt zu werden.

Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Stellos et al., die neben der erhöhten GPIIb/IIIa- auch eine erhöhte P-Selektin-Expression bei Patienten mit schneller kognitiver Verschlechterung zeigte²⁵², zeigte die hier vorliegende Analyse eine signifikant erniedrigte Expression von P-Selektin durch Stimulation mit sowohl U46619 und ADP auf der Plättchenoberfläche, was eine erniedrigte Degranulationsrate der alpha-Granula nahelegt²⁴⁷. In der Untersuchung von Kozubski et al., die sich auf eine sehr kleine Stichprobe bezieht (AD-Patienten: n=12), konnte ebenfalls eine erniedrigte Expression von CD62P in AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt werden²²⁸. Allerdings fand diese Studie eine erniedrigte GPIIb/IIIa-Rezeptor-Expression, die jedoch nicht über Pac1, sondern die einzelnen Bestandteile des Rezeptors (CD41 und CD61) gemessen wurde.

Ein ähnliches Verhalten der CD62P-Expression wurde kürzlich von Järemo et al. als „P-Selectin-Paradoxon“ beschrieben²⁵³; diese Arbeitsgruppe zeigte eine Erhöhung des löslichen P-Selektins im Plasma von AD-Patienten, wohingegen das P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Stimulation mit Agonisten verringert war. Außerdem zeigten Järemo et al. in einer früheren Untersuchung, dass AD-Thrombozyten weniger dicht sind, als die von gesunden Kontrollen, was auf einen geringeren Gehalt an Granula hindeutet²⁵⁴.

Passend dazu konnten Kessler et al. mittels Elektronenmikroskopie zeigen, dass Thrombozyten von AD-Patienten insgesamt weniger Dichtegranula enthalten, als die von gesunden Kontrollen, obwohl die Anzahl der Dichtegranula bei gesunden Probanden im Alter tendenziell eher zunehmen²⁵⁵. Ob diese Beobachtung auch für α -Granula gilt, ist bisher nicht untersucht worden. Dennoch gibt diese Untersuchung Hinweise, dass eine verringerte Expression der Degranulationsmarker auch darin begründet sein könnte, dass die gesunden Probanden (ähnlichen Alters wie die Patienten) mehr Granula besitzen, die dann unter Aktivierung auch über die Oberflächenmarker gemessen werden können. Umgekehrt könnten die Thrombozyten der AD-Patienten dennoch mehr Aktivität aufweisen und zwar proportional normal degranulieren, was aber allein durch die absolute Oberflächenexpression nicht beurteilbar ist. Für eine sinnhafte Analyse müssten also sowohl die Oberflächenexpression der Degranulationsmarker CD62P und CD63 als auch die

absolute Zahl der Granula bekannt sein. Daraus könnte der Anteil der degranulierenden an der absoluten Granulazahl bestimmt werden und somit Rückschlüsse auf das Degranulationslevel gezogen werden.

Interessanterweise wurde Presenilin 1, dessen Gen in der Einleitung bereits als Risikofaktor für die AD benannt wurde, in der Membran von α -Granula identifiziert²⁵⁶ und gibt einen weiteren Hinweis auf die mögliche Veränderung thrombozytärer Membranen bei der AD²⁵⁷. Eine Studie von Ozsavci et al. ergänzt die Diskussion der Plättchenaggregation und den Einfluss der Membranfluidität und Ernährung, der oben bereits diskutiert wurde, auch für Degranulationsmarker insoweit, dass eine reduzierte CD62P-Expression nach Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit Hypercholesterinämie gefunden wurde²⁵⁸.

4.2.2 Thrombozytenaggregation und -degranulation unter AChE-I Therapie

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren über den Therapieverlauf von sechs Monaten zu einem generellen Absinken der thrombozytären Aktivität führt. Die Therapie mit AChE-I könnte auf vier mögliche Arten die Thrombozytenfunktion beeinflussen:

- 1.) In ihrer Funktion als Hemmstoff der AChE verhindern sie den Abbau von ACh und sorgen für eine höhere Konzentration von ACh, das selbst direkte Wirkung auf die Thrombozyten über den nAChR $\alpha 7$ hat.
- 2.) Weiterhin könnten auch direkte Wirkungen der AChE-I, die unabhängig von der Erhöhung des ACh sind, eine Rolle spielen.
- 3.) Durch die Hemmung der AChE können auch allosterische Wirkungen dieses Enzyms, die unabhängig von seiner katalytischen Wirkung sind, vermindert stattfinden. Veränderungen der AChE-Isoformen bei AD wurden sowohl zentral, als auch in peripheren Zellen (e.g. Thrombozyten) beschrieben²⁵⁹
- 4.) Durch den AChE-I Rivastigmin wird nicht nur die AChE gehemmt, sondern auch die Butyrylcholinesterase (BChE). Auch dieses Enzym könnte für 1.) und 2.) eine Rolle spielen.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die unstimulierte Aggregation der Thrombozyten im gemischten Modell einen Trend zur Signifikanz aufweist, wenn die Verlaufsmessungen untereinander verglichen werden. Nach Therapiebeginn mit AChE-I nimmt die Aggregation zunächst zu (MP0 bis MP1(im Trend)), dann aber wieder ab. Diese Abnahme ist im Post-hoc Tukey-Kramer Test nicht signifikant, allerdings zeigt sich im Gegensatz zu den Messwerten MP1 und MP2 eine signifikante Erniedrigung des MP3 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Die Degranulationsrate der AD-Patienten ist stets niedriger als bei gesunden Kontrollen. Über den Therapieverlauf hinweg verringerte sich die Expression der Degranulationsmarker von CD62P und CD63 weiter, was unterstützt, dass ACh eine anti-degranulatorische Wirkung aufweisen könnte. In der vorliegenden Untersuchung ist die Entwicklung unter AChE-I Therapie im gemischten Modell allerdings nur für CD62P signifikant.

Der Effekt von Acetylcholin auf Thrombozyten und damit auch die Auswirkungen einer AChE-Hemmung ist noch nicht eindeutig geklärt¹⁸⁰. Die Aktivierung des nAChR $\alpha 7$ auf den Thrombozyten führt zu einem Calciumeinstrom und verstärkt dann möglicherweise die Fibrinogenrezeptor-Aktivierung¹¹⁴. Auch eine Blockade dieses Calciumeinstroms verschlechterte die Plättchenfunktion in vitro. Die Aktivierung, jedoch nicht die Plättchendegranulation waren durch Agonisten dieses Rezeptors beeinflusst, was eine Rolle des Rezeptors in der frühen Aggregation vermuten lässt¹¹⁴. Kooijman et al. hingegen zeigten, dass der nAChR auf Thrombozyten für eine regelhafte Aktivität der Thrombozyten notwendig ist. So zeigte sich bei Fehlen des nAChR $\alpha 7$ Rezeptors auf Thrombozyten von Mäusen eine höhere Expression des GPIIb/IIIa als Reaktion auf Stimulation mit ADP, als in Gegenwart des Rezeptors. Somit kommt dem nAChR $\alpha 7$ eine regulierende Rolle der Aggregationsantwort auf Thrombozytenstimulantien zu.

Die Zugabe des selektiven Agonisten am nAChR $\alpha 7$, PNU-282987 hemmte die ADP induzierte Plättchenaggregation, was zu der schon zuvor beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkungen des cholinergen Systems passt¹⁶⁸. Durch eine Erhöhung des Acetylcholin-Levels auch peripher, ist anzunehmen, dass AChE-I einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben. Dieser Einfluss ist in erster Linie durch die Acetylcholin-Wirkung auf Thrombozyten begründet. Dieser ist in vivo noch nicht abschließend geklärt. So bleibt also unklar, welche Wirkung die AChE-I tatsächlich auf die Thrombozyten haben.

Das Absinken der Thrombozytenaggregation nach ca. 6-monatiger Therapie deutet darauf hin, dass die Therapie mit AChE-I einen anti-aggregatorischen Effekt aufweist. Der Verlauf der Aggregation unter Therapie mit AChE-I hat sowohl unter Stimulation mit AA als auch mit ADP zunächst eine leicht steigende Tendenz der Mittelwerte, fällt dann aber zum letzten Messzeitpunkt signifikant ab. Die AChE-I Therapie scheint somit über die Erhöhung des ACh-Spiegels im peripheren Blut eine Hemmung der Thrombozytenaggregation und -degranulation zu bewirken, wie sie bereits von Bennett et al. beschrieben wurde¹⁸⁰. Die Plättchenaktivierung wurde auch von Bennett et al. über die durchflusszytometrische Messung des CD62P auf der Plättchenoberfläche gemessen. Dabei zeigten sie, was konsistent zu unseren Ergebnissen ist, dass ACh die Expression von CD62P verringert¹⁸⁰. Bennett et al. vermuten einen über NO und das Calcium-Calmodulin-System vermittelten inhibitorischen Effekt von ACh auf die Thrombozyten¹⁸⁰. Schedel et al. zeigen allerdings im Gegenteil, dass eine Stimulation des nAChR $\alpha 7$ durch Agonisten eine Aktivierung der Thrombozyten bewirken¹¹⁴. Was wie ein Widerspruch anmutet, könnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit damit erklärt werden, dass die Aggregation abhängig von der Therapiedauer mit AChE-I, und damit möglicherweise mit dem ACh-Spiegel, zunächst ansteigt und dann wieder abfällt.

Interessanterweise gibt es Hinweise, dass sich die neuronale AChE im Tierexperiment mit A β zusammenfindet und die Amyloidfibrillenbildung beschleunigt¹²⁹. A β ist in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren¹⁴⁷. Durch die Hemmung der AChE könnte somit die Bindung von A β und Bildung von A β -Fibrillen verringert sein und dadurch eine verringerte Plättchenaktivierung begünstigen. Auch die BChE steht im Verdacht, an der Bildung von toxischen A β -Fibrillen beteiligt zu sein²⁶⁰, auch da sie in einer Studie wesentlich mehr in den kortikalen Amyloid-plaque-Regionen im Gehirngewebe von AD-Patienten als in dem von Kontrollen vorkam²⁶¹. Die BChE, die auch im Plasma vorkommt^{259, 262}, wird ebenfalls von Rivastigmin gehemmt. Reale et al. beschrieben, dass sowohl die AChE als auch die BChE im Plasma von AD-Patienten verglichen mit dem Plasma gesunder Kontrollen vermehrt exprimiert war²⁶³.

Mechanistisch konnte für einen anderen AChE-I, Donepezil, gezeigt werden, dass eine sechsmonatige Therapie zu einer verringerten Expression der BACE1 führt¹²⁸. Die BACE1 katalysiert die erste Spaltung des APP auf dem amyloidogenen Weg. Damit kann Donepezil ein direkter Effekt auf die APP-Spaltung zugeordnet werden. Studien bezüglich dieser Wirkung für Rivastigmin fehlen bisher und müssten durchgeführt

werden, um auch hier Erklärungsansätze für die veränderte Thrombozytenfunktion zu finden.

Unter Therapie mit Donepezil konnte außerdem eine Erhöhung der PLA2-Aktivität und eine Erhöhung der phosphorylierten GSK3b in Thrombozyten festgestellt werden¹⁸¹. Ersteres könnte für eine Reduktion der A β -Produktion sorgen, zweiteres für eine verringerte Phosphorylierung von Tau durch Inaktivierung des Enzyms (durch Phosphorylierung)¹⁸¹. Die nachgewiesene Erhöhung der PLA2 in Plättchen von AD-Patienten durch Donepezil verstärkt die Annahme, dass die Herunterregulierung der neuronalen PLA2 bei AD Patienten auf die Thrombozyten übertragbar ist (siehe oben), was wiederum Einfluss auf die AA-Freisetzung und damit Aktivierung haben könnte. Interessanterweise finden auch Donovan et al. in einer Proteomanalyse der Plättchenmembran hauptsächlich Veränderungen der Proteine bei AD-Patienten, die in die Plättchenaktivierung involviert sind²⁶⁴.

Fibrinogenrezeptorexpression

Die Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors bleibt auch unter AChE-I-Therapie ähnlich und verändert sich in den Verlaufsmessungen nicht signifikant, ist aber stets höher als bei gesunden Kontrollen, was auf ein erhöhtes thrombozytäres Aktivierungslevel hindeutet. Diese Erkenntnisse unterstützen die Vermutung von Schedel et al., dass eine Aktivierung des nAChR $\alpha 7$ über einen Calciumeinstrom vornehmlich die Plättchenaktivierung fördert und den Fibrinogenrezeptor aktiviert. Allerdings ist dies nicht konsistent mit der erniedrigten PAC1-Expression unter gesunden Kontrollen. Geht man bei AD von einem cholinergen Mangelzustand, auch peripher aus, so müssten unbehandelte AD-Patienten ein niedriges ACh-Niveau, und damit auch eine erniedrigte Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors gegenüber den behandelten AD-Patienten aufweisen. Dies kann hier nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Zahl der untersuchten AD-Patienten zu klein, um diesen Effekt nachweisen zu können.

In Anbetracht dieser Erkenntnisse bleibt die Frage offen, wie die tatsächlich gemessene Aggregationsfähigkeit bei AD-Patienten und auch im Verlauf erniedrigt sein kann, ebenso die Degranulation, die Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors aber im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht.

4.3 Veränderungen in Thrombozytenzahl und -indizes

In dieser Studie wiesen AD-Patienten signifikant niedrigere Thrombozytenzahlen auf, als gesunde Kontrollen. Im Verlauf der AChE-I-Therapie zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung der Thrombozytenzahlen über die Messzeitpunkte. Hierbei ist insbesondere der Anstieg der Thrombozytenzahl nach einem (signifikant) und drei Monaten (Trend) Therapie im Vergleich zum unbehandelten Zustand zu bemerken. Der Thrombokrit der AD-Patienten ist sowohl vor Therapiebeginn als auch nach sechs Monaten Therapie signifikant niedriger, als bei gesunden Kontrollen.

Chen et al. entdeckten eine niedrigere Thrombozytenzahl bei Patienten mit moderater AD als bei schwerer AD²⁶⁵. Bei den Patienten unserer Studie, die eine signifikant niedrigere Plättchenzahl als gesunde Kontrollen aufwiesen, handelte es sich um Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD. Das Gegenteil wurde 1993 von Inestrosa et al. beschrieben: Hier zeigte sich die Thrombozytenzahl im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht²⁶⁶. Allerdings beschrieben Gowert et al., dass der Einfluss von A β auf die Thrombozyten intrazellulär zu einer erhöhten Caspase-Aktivität führt, die wiederum Apoptose induziert¹⁴⁷, was konsekutiv zu einer erniedrigten Plättchenzahl führt. Gowert et al. zeigten, dass die Behandlung von Plättchen mit A β in vitro zu Plättchenaktivierung und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, was ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate zur Folge hat¹⁴⁷. Ebenfalls modulieren Plättchen das A β in eine fibrilläre Struktur, die von apoptotischen Thrombozyten aufgenommen wurde, nicht aber von vitalen¹⁴⁷. Diese Entdeckungen führten zur Hypothese, dass Plättchen maßgeblich zur Bildung der cerebralen Amyloid Angiopathie (CAA) beitragen, ebenfalls liefern sie aber auch ein Erklärungsmodell für die verringerte Plättchenanzahl unter AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Da die A β -Werte im Plasma zumindest zu Beginn der AD bzw. beim Übergang von MCI zu AD noch höher sind, als bei gesunden Kontrollen⁵⁸ (siehe Song et al. 2011, *Abbildung 1*), könnte dies ein Grund für die signifikant erniedrigte Plättchenzahl der AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen sein.

In einer Studie von Sun et al. 2018 konnte kein signifikanter Unterschied der Plättchenzahlen von AD-Patienten und gesunden Kontrollen gefunden werden, allerdings konnte gezeigt werden, dass die im Plasma nachgewiesene Konzentration des 42 Aminosäuren langen A β -Proteins mit der Plättchenzahl korreliert²⁶⁷ (nicht jedoch das A β 40, einer A β -Form mit nur 40 Aminosäuren). In Zusammenschau mit der

Meta-Analyse von Song et al., die ein erniedrigtes Plasma A β -Level unter AD-Patienten zeigen, bestätigt das unsere Ergebnisse einer erniedrigten Plättchenanzahl unter AD-Patienten. Sun et al. schlussfolgerten, dass Thrombozyten sowohl eine Rolle in der peripheren A β -Produktion als auch in seiner Entsorgung spielen.

Darüber hinaus könnten generelle Gründe auf die Messung erniedrigter Plättchenzahlen einen Einfluss genommen haben: Es könnten insgesamt weniger Thrombozyten gebildet worden sein oder aber sie könnten einer erhöhten Abbaurrate unterliegen. Methodisch könnten durch artifizielles Clotting nicht alle Plättchen einzeln gemessen worden sein und so eine falsch niedrige Thrombozytenzahl angezeigt worden sein. In unseren Messungen zeigte sich im Multiplate® keine erhöhte Aggregation, weswegen keine Hinweise auf eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verkleben bestehen. Auch eine Verklebung innerhalb des Messgerätes ist bei dem auch für Routineuntersuchungen des Blutspendedienstes verwendeten CellDyn-Gerätes und den damit einhergehenden regelmäßigen Reinigungen und Eichungen unwahrscheinlich.

Der Anstieg der Plättchenzahl während der Therapie von AChE-I könnte entweder durch eine verringerte Apoptoserate begründet sein oder aber durch einen Einfluss der AChE-I auf die Thrombopoese. Auf den Megakaryozyten konnte ebenfalls der nAChR $\alpha 7$ identifiziert werden¹⁶⁶, was einen Einfluss der AChE-I auf die Thrombopoese denkbar macht.

Der Anstieg der Thrombozytenzahl nach Therapiebeginn bleibt kontrovers, da der Thrombokrit sowohl bei unbehandelten AD-Patienten als auch bei Patienten nach sechsmonatiger Therapie niedriger ist, als bei gesunden Kontrollen. Im gemischten Modell zeigen sich hier keine signifikanten Anstiege zu Therapiebeginn, was somit eher auf einen konstant niedrigeren Volumenanteil der Thrombozyten im Verhältnis zum Gesamt-Blutvolumen spricht.

Frühere Studien zeigen ein verringertes mittleres Plättchenvolumen (MPV= Mean platelet volume) und eine verminderte Plättchenverteilungsbreite (PDW= Platelet distribution width) bei AD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen^{268, 269}. Besonders das MPV korrelierte mit dem MMSE und somit der kognitiven Funktion und wurde daher auch als potenzieller Marker für AD diskutiert^{165, 269}. In der vorliegenden Untersuchung konnte dies nicht bestätigt werden.

4.4 Veränderungen im Blutbild der Alzheimer Patienten

Erythrozytenindizes

In der vorliegenden Untersuchung konnte ein signifikant erniedrigtes MCV der AD-Gruppe zum Messpunkt 3 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Dabei bewegten sich die Mittelwerte beider Gruppen in den physiologischen Normbereichen. Im gemischten Modell zeigen sich keine Veränderungen über den Zeitverlauf, sodass nicht von einem Einfluss der AChE-I auf das MCV ausgegangen werden kann.

Im Gegensatz dazu wiederholen sich die Ergebnisse der Literatur zu Gunsten eines leicht erhöhten MCVs, weisen aber auch Kontroversen auf.

Chang et al. fanden ein erhöhtes MCV in AD-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen²⁷⁰. Allerdings war ihre Stichprobe sehr klein (AD: n=21 und KO: n=23) und es finden sich weder Angaben zur AChE-I-Therapie noch zum Krankheitsstadium. Auch bei Chang et al. bewegten sich alle MCV-Werte in der Norm, allerdings war der Mittelwert der AD-Gruppe um den Faktor 1,034 größer, als bei gesunden Kontrollen. In der vorliegenden Studie verhielt es sich genau umgekehrt; die gesunden Kontrollen weisen einen 1,04-fach höheren MCV-Wert auf, als die -allerdings behandelten- AD-Patienten. Das MCV der unbehandelten AD-Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Eine Stärke der Chang- Studie ist, dass alle Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt oder Schlaganfall, aber auch mit Hypertonie oder Dialysepflichtigkeit, ausgeschlossen wurden und so potenzielle Confounder durch entsprechende Medikation oder kardiovaskulär manifesten Erkrankungen, sowie Einflüsse auf die Osmolarität der Zellen durch Nierenversagen ausgeschlossen wurden. Eine ähnliche Studie von Gamaldo et al. fand ebenfalls eine positive Korrelation der Erythrozytengröße mit einer Verschlechterung der kognitiven Funktion²⁷¹. Hier wurde u.a. für Albumin, Folsäure, Vitamin B12, Ferritin und Eisen adjustiert²⁷¹. Auch Chen et al. maßen ein erhöhtes MCV bei AD Patienten (n=92) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=84)²⁶⁵. Hier war das MCV im Mittelwert bei AD-Patienten um den Faktor 1,03 höher, als bei gesunden Kontrollen. Relativ konnten sie außerdem ein niedrigeres Level an Folsäure und Vitamin B12 bei AD-Patienten messen, womit die Veränderungen erklärt wurden²⁶⁵. In keiner der Studien wurde der Tageszeitpunkt der Blutentnahme berichtet. Zhang et al. beschreiben eine intraindividuelle Schwankung der Zellgröße aufgrund von Anpassungen im

Tagesverlauf²⁷², auch in der vorliegenden Studie konnte die Blutentnahme nicht konstant zur selben Uhrzeit durchgeführt werden. Weitere Studien zeigten ebenfalls die Erhöhung des MCV bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und eine Korrelation der Erythrozytengröße mit der kognitiven Funktion^{271, 273}.

Interessanterweise fanden Milovanovic et al., dass verschieden dichte Plättchenfraktionen sich bei gesunden Senioren umgekehrt proportional zum MCV verhalten. Ein höheres MCV war mit einer erniedrigten Plättchenaktivität assoziiert. Diese Plättchenaktivität wurde über die CD62P-Expression und die tatsächliche Bindung von Fibrinogen auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung mit ADP gemessen²⁷³. In der vorliegenden Untersuchung konnte gegensätzlich dazu eine positive Korrelation zwischen der stimulierten CD62P-Expression und dem MCV unter allen Datenpunkten (AD-Patienten behandelt und unbehandelt sowie gesunde Kontrollen) festgestellt werden (Pearson: 0,294 mit $p=0,002$ bei CD62P_AD, 0,226 mit $p=0,019$ bei CD62P_U46619). Allerdings ergab die Analyse keine Korrelation mit der Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors und dem MCV. Milovanovic erklären den Einfluss der Erythrozytengröße auf die Plättchenaktivität und umgekehrt mithilfe einer Untersuchung von Reimers et al., die zeigen, dass Erythrozyten unter mechanischem Stress geringe Dosen ADP freisetzen, was zu einer erhöhten Plättchenaktivität führt²⁷⁴. Wie genau Erythrozytenvolumen und Plättchenaktivität in Zusammenhang stehen, bleibt unklar.

Die Ergebnisse dieser Studie basieren auf einem Mittelwertvergleich mit einer zu MP3 sehr kleinen Stichprobe ($n=6$), die die Aussagekraft limitiert. Sie erlauben aber eine pathophysiologische These: Ein möglicher Confounder im Zusammenhang mit den Erythrozytenindizes ist die Zeit und damit verbundene Dauer und das Fortschreiten der Alzheimer-Erkrankung. Die Demenz führt zu fehlendem Durst- und Hungerempfinden und könnte durch zu wenig Flüssigkeitsaufnahme zu einer hypertonen Dehydratation führen, die konsekutiv durch osmotische Diffusion dann zu einer Schrumpfung der Erythrozyten führt. Aufgrund des Verlustes neuronaler Signalwege wird bei Alzheimer-Demenz die Unfähigkeit, die Wasser-Homöostase des Körpers aufrecht zu erhalten als Symptom, besonders als Frühsymptom neuronaler Dysfunktion diskutiert²⁷⁵. Außerdem führt die AD graduell zu einem Verlust an Körperfunktion, wobei sowohl die intellektuelle Fähigkeit verloren gehen kann, Nahrung als solche zu erkennen, als auch der motorische Schluckakt häufig nur verschlechtert abläuft, was ebenfalls eine Dehydratation zur Folge hat^{276, 277}.

Das Erythrozytenvolumen hängt ab von der Membranpermeabilität und den konsekutiven Kationenströmen. Messbar wird diese Veränderung durch Analyse des Kationengehalts der Zellen oder Kennzahlen der Erythrozytenhydratation wie der mittleren korpuskularen Hämoglobinkonzentration (MCHC)²⁷⁸. Das MCHC von unbehandelten AD-Patienten unterscheidet sich nicht von den gesunden Kontrollen. Im Verlauf der Behandlung mit AChE-I steigt das MCHC signifikant im Vergleich zu den vorherigen Messpunkten an. Auch das mittlere korpuskulare Hämoglobin (MCH) weist einen signifikanten Anstieg über den Therapieverlauf auf. Winchester et al. stellen in ihren Untersuchungen über die Verteilung der Erythrozytenindizes bei AD Patienten und Kontrollen fest, dass vor allem das MCH und die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) die Erythrozytenindizes sind, die am stärksten mit kognitiven Folgen assoziiert sind²⁷⁹. Außerdem konnten sie ebenfalls in einer Analyse von 738 Patienten zeigen, dass nicht das MCV selbst, sondern die Verteilung des MCV unter AD-Patienten signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt ist²⁷⁹. In der oben genannten Untersuchung von Chen et al. konnten erhöhte MCH und MCHC-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden werden²⁶⁵.

Basophile

Weiterhin zeigten sich signifikant erniedrigte Basophilenzahlen (anteilig an den gesamten Leukozytenzahlen) in der AD-MP3 Gruppe im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Auch für den Verlauf der Basophilen ergab sich ein Trend zu einer Reduktion der Basophilenzahlen über den Verlauf der Therapie.

Während in einer Studie eine Erhöhung der Basophilenzahlen bei AD- und MCI-Patienten gezeigt wurde²⁸⁰, fanden Shad et al. eine ebenfalls erniedrigte Anzahl der Basophilen (unter 1% der WBC), wohingegen Monophile und Neutrophile erhöht waren²⁸¹. Für Shad et al. zeigt dies einen hohen Verbrauch an Basophilen an, der durch den chronisch allergisch-inflammatorische Zustand der AD-Patienten zu begründen ist²⁸¹.

Auch die Eosinophilen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich der gesunden Kontrollen zu MP1 signifikant erniedrigt. Das Verhalten von Eosinophilen bei AD-Patienten ist bisher nur wenig untersucht. Järemo et al. untersuchten eosinophile und neutrophile Granulozyten in ihrer Dichteverteilung und fanden, dass AD-Patienten weniger Eosinophile und Neutrophile niedrigerer Dichte aufwiesen, als

gesunde Kontrollen²⁵⁴. Dies führen sie auf die Theorie zurück, Granulozyten könnten, wie Plättchen, im zirkulierenden Stadium aktivieren und damit degranulieren und so in ihrer Dichte abnehmen²⁵⁴. Die absolute Zahl der Eosinophilen wurde in Järemo's Studie nicht gemessen.

4.5 Veränderungen im inflammatorischen Niveau

Zytokine spielen eine bidirektionale Rolle als Vermittler zwischen ZNS und Immunsystem²⁸². So können Zytokine im ZNS die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen im Blut fördern^{283, 284}. Auch umgekehrt können Zytokine aus dem Blut die Blut-Hirn-Schranke überqueren und deren Permeabilität erhöhen^{285, 286}. Reale et al. fanden eine erhöhte Freisetzung der Zytokine IL-1 β und TNF α nach Stimulation von peripheren mononukleären Zellen mit A β bei AD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen¹⁹⁴. Ebenfalls waren die Spiegel der Enzyme Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase, sowie das Plasma-A β bei AD Patienten in dieser Studie signifikant erhöht, wohingegen sich das ACh selbst im Trend erniedrigt zeigte¹⁹⁴. In derselben Untersuchung konnte auch gezeigt werden, dass ACh über den nAChR α 7 eine anti-inflammatorische Wirkung aufweist und die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine reguliert¹⁹⁴. Damit liegt ein erhöhtes Zytokin-Niveau bei erniedrigtem ACh-Level und erhöhter Expression der jeweiligen Esterasen bei AD-Patienten nahe. Shytle et al. führten 2004 die Hypothese des cholinergen anti-inflammatorischen Pathways ein, indem sie zeigten, dass eine Aktivierung des nAChR α 7 über Nikotin auf Mikroglia eine verringerte Lipopolysaccharid-induzierte TNF α -Antwort zur Folge hatte²⁸⁷, was auch von anderen Autoren über Aktivierung des nAChR α 7 gezeigt werden konnte^{111, 288, 289}.

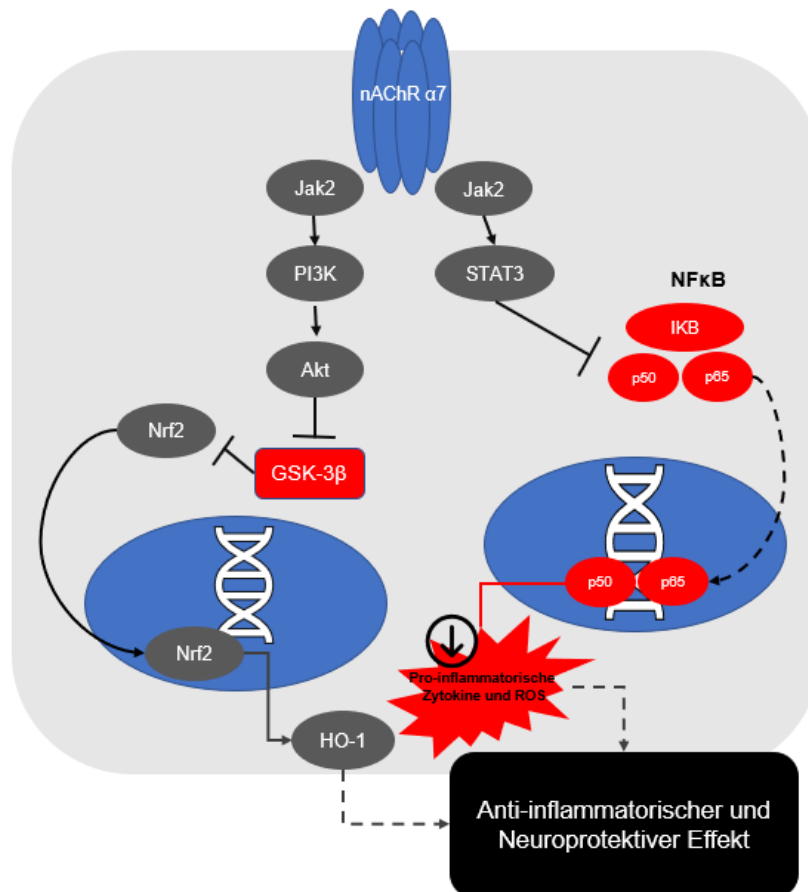


Abbildung 36 – Anti-inflammatorischer Pathway über den nAChR $\alpha 7$

Schematische Darstellung der intrazellulären anti-inflammatorischen Signalwege nach Aktivierung des nAChR $\alpha 7$. Die Aktivierung der Januskinase 2 (Jak2) führt zu einer Hemmung der p65 Translokation und damit verringerten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen. Über eine Aktivierung des Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) Signalweges wird Häm-Oxygenase 1 (HO-1) überexprimiert, was zusätzlich einen anti-inflammatorischen und neuroprotektiven Effekt hat. Abbildung in Anlehnung an: Egea et al., Figure 1, S.466²⁸⁸.

Die Aktivierung des Jak2/STAT3 pathways hat eine neuroprotektive Wirkung und eine Veränderung dieses Signalweges wird auch diskutiert, an AD beteiligt zu sein²⁹⁰. Der Einsatz der AChE-I Donepezil und Galantamin wies einen neuroprotektiven Effekt gegen durch Glutamat induzierte Neurotoxizität auf, die über Jak/Stat Signalwege nach Aktivierung des nAChRs auch bei AD eine Rolle spielt^{288, 291} (Abbildung 36).

Daher entstand in der vorliegenden Untersuchung die Frage, ob das inflammatorische Zytokin-niveau bei AD-Patienten erhöht ist und AChE-I in der Lage sind, das inflammatorische Niveau der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α bei AD-Patienten zu verändern. In der Vergangenheit konnten neuroprotektive Eigenschaften der AChE-I Donepezil, Rivastigmin und Galantamin gezeigt werden, die vorrangig über eine

Wirkung des nAChR $\alpha 7$ begründet wurden, aber wahrscheinlich nicht über deren direkte Wirkung auf die AChE^{291, 292}. Sie waren vielmehr in der Lage, die Rezeptordichte der nAChR zu erhöhen²⁹¹. Die nAChR $\alpha 7$, die auch auf Thrombozyten exprimiert sind, setzen bei Makrophagen den sogenannten „Anti-inflammatorischen Pathway“ in Gang, der die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (u.a. TNF α und IL-1 β) herunter- und die anti-inflammatorischer Zytokine hochreguliert^{288, 293-295}.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Theorie einer Verstärkung des anti-inflammatorischen Pathways bei AChE-I-Therapie nicht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass IL-1 β bei AD-Patienten im Mittelwert zu jedem Messzeitpunkt höher ist als bei gesunden Kontrollen. Zu MP0 und MP1 ergibt sich ein statistischer Trend, zu MP3 zeigt sich das IL-1 β Level hochsignifikant erhöht. Diese Erkenntnisse fügen sich ein in das Bild des peripheren proinflammatorischen Zustandes der AD-Patienten, was von mehreren Arbeitsgruppen postuliert wurde^{186, 282, 296-298}. In einer anderen Meta-Analyse konnte das erhöhte inflammatorische Niveau bei Patienten mit MCI allerdings nicht gefunden werden²⁹⁹, was die Theorie der Progression zur AD durch inflammatorische Prozesse³⁰⁰ in Frage stellt, sondern eher eine Erhöhung des inflammatorischen Niveaus als Antwort auf die pathophysiologischen Prozesse der AD vermuten lässt. Darüber hinaus ist allerdings bekannt, dass IL-1 β die fortschreitende Neurogeneration bei AD begünstigt^{191, 301}. Jedoch ist hier nicht eindeutig, was Ursache und Wirkung ist. Shaftel et al. argumentieren mit ihren Ergebnissen, dass durch Lipopolysaccharid-induziertes IL-1 β im Hippocampus (im Mausmodell) zu einer Reduktion des A β -Loads führt, und das IL-1 β damit möglicherweise eine adaptive Antwort zur Beseitigung von A β darstellt³⁰². Diese Theorie fügt sich ein in das Zunehmen der IL-1 β -Spiegel gegenüber gesunden Kontrollen über den Zeitverlauf und damit Krankheitsprogress, wie er in dieser Studie gezeigt werden konnte.

Entgegen den Vermutungen, dass eine vermehrte Aktivierung des cholinergen Systems durch AChE-I eine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt, konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass IL-1 β im Verlauf der AChE-I Therapie ansteigt (im Mittelwert, keine Signifikanz im Verlauf im gemischten Modell) und sich nach dem längsten Beobachtungspunkt sogar signifikant von gesunden Kontrollen unterscheidet. Möglicherweise senken AChE-I über den anti-inflammatorischen Effekt des Acetylcholins den Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins, jedoch nicht stark genug, um den generellen Anstieg des inflammatorischen Niveaus im Verlauf der AD auszubalancieren.

In einer Meta-Analyse von Swardfager et al. zeigt sich zwar ein Überwiegen der Studien, die ein erhöhtes Zytokinlevel von IL-1 β , TNF α und IL-6 im peripheren Blut nahe legen, allerdings schränken auch sie die Ergebnisse insofern ein, dass sich die Sekretion von Zytokinen in den verschiedenen Stadien der Krankheitsprogression unterscheidet und die Studien damit ohne Einbezug dieses Faktors wenig vergleichbar sind³⁰³. Dies scheint besonders für IL-1 β zu gelten: Holmes et al. konnten ebenfalls zeigen, dass höhere Spiegel von IL-1 β im Plasma mit schnellerer kognitiver Verschlechterung assoziiert waren³⁰⁴. Unsere Studienpatienten befanden sich noch im Stadium der milden bis moderaten AD, sodass ein Fortschreiten der AD hier passend zu dem Anstieg der Interleukin-Werte möglich ist.

Das Profil inflammatorischer Zytokine unter AChE-I Therapie ist in der Literatur noch immer uneindeutig. Maurer et al. beschreiben in ihrem Review zwar, dass Inflammation über Zytokine die Gedächtnisleistung bei AD verschlechtern und cholinerge Aktivierung in der Lage ist, Gedächtnisleistung zu verbessern, jedoch bleibt die Verbindung über die anti-inflammatorische Wirkung des cholinergen Systems uneindeutig⁹⁶. Richardson et al. konnten bei AD-Patienten keine Veränderung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α im peripheren Blut von Patienten mit AChE-I Therapie im Vergleich zu unbehandelten Patienten finden²⁸². Auch in den vorliegenden Daten dieser Studie lässt sich kein Unterschied bei IL-1 β , IL-6 und TNF α im Verlauf der AChE-I-Therapie finden. Im Gegensatz hierzu fanden frühere Studien von Gambi et al. und Reale et al. erniedrigte IL1 β , IL-6 und TNF α -Werte nach einmonatiger AChE-I Therapie mit Donepezil, obwohl PBMCs der unbehandelten AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen mehr IL-6 und IL-1 β sezernierten^{263, 305}. Allerdings wurde in der vorliegenden Untersuchung, wie auch bei Richardson et al., eine Untersuchung der Zytokinspiegel im Serum vorgenommen, im Gegensatz zu einer Messung der Freisetzung der Zytokine von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), wie sie bei Reale et al. und Gambi et al. erfolgte²⁸². Kürzlich fanden Kokras et al. ein erhöhtes Level an IL-1 β , TNF α und IL-6 unter AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und ein Absinken der Konzentrationen unter ACHE-I-Therapie³⁰⁶. In einer Meta-Analyse fanden Shen et al. eine signifikante Erhöhung des IL-6 und IL-1 β bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, die in unserer Studie nur für IL-1 β bei behandelten AD-Patienten reproduziert werden konnte¹⁹¹. In der vorliegenden Studie unterscheidet sich das IL-6-Niveau weder vor Beginn der Therapie noch im Verlauf der Behandlung signifikant von gesunden Kontrollen. IL-6

wird von Mikroglia und Astrozyten um A β -Ablagerungen freigesetzt, was die AD-Pathologie verschlechtern kann^{186, 191, 307}.

Auch für TNF- α ließ sich kein Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und den AD-Patienten, sowie den AD-Patienten im Therapieverlauf erkennen.

Die Studienlage zum Zytokinspiegel bleibt also kontrovers¹⁹¹ und sollte in größeren Studien mit vergleichbaren Methoden weiter untersucht werden, auch um mögliche Einflüsse auf die Krankheitsprogression und -ätiologie zu klären.

4.6 Geschlechterspezifische Unterschiede

Im Juni 2015 veröffentlichten die „National institutes of Health“ der USA eine „guide notice“, in der die allgemeine Forderung zur Betrachtung des Geschlechts in der Forschung, vor allem der präklinischen Forschung, gestellt wurde (Consideration of Sex as a Biological Variable in NIH-funded Research, Notice Number: NOT-OD-15-102). Auf Basis dieser Forderung wurden zahlreiche Argumente gefunden, geschlechterspezifische Untersuchungen auch in der neurowissenschaftlichen Forschung anzuwenden³⁰⁸. Das cholinerge System im Gehirn weist Unterschiede zwischen Männern und Frauen auf; so scheinen die cholinergen Aktivitäten in ihrer Lokalität unterschiedlich verteilt zu sein. Im Tierexperiment findet sich bei weiblichen Tieren vermehrte cholinerge Aktivität im frontalen Kortex, bei männlichen Tieren im Hippocampus³⁰⁹. Ebenso scheinen weibliche Tiere mehr, aber kleinere cholinerge Neurone im Vorderhirn zu haben als männliche Tiere^{309, 310}. Bezogen auf die AD zeigt sich, dass heterozygote ApoE4-Trägerinnen ein höheres Risiko haben, an einer AD zu erkranken oder eine MCI zu entwickeln, als männliche heterozygote ApoE4-Träger^{309, 311, 312}. Ein Zusammenhang des Geschlechts mit dem cholinergen System legt eine veränderte Wirkungsweise der AChE-I-Therapie bei Männern und Frauen nahe. In Untersuchungen wiesen männliche Ratten eine siebenmal höhere Aktivität der BuChE und der AChE im Plasma auf als weibliche Tiere³¹³.

In der vorliegenden Untersuchung steigen die MCH- und MCHC-Werte sowie der Hb im Verlauf der AChE-I-Therapie bei männlichen Patienten signifikant an, bei weiblichen Patienten ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Auch die Thrombozytenaktivität ist in der unstimulierten Aggregation im Multipalte verschieden: Bei männlichen Patienten steigt sie zunächst stark an (nach einem Monat Therapie) und fällt dann auf dasselbe Niveau wie bei den männlichen gesunden Kontrollen zurück. In der Literatur lassen

sich bisher keine geschlechterspezifischen Differenzierungen zu diesen Untersuchungen finden. Auch wenn die in dieser Arbeit erstmals beobachteten Unterschiede in Thrombozytenaggregation zwischen Männern und Frauen im Verlauf der AChE-I-Therapie keine Rückschlüsse auf Kausalitäten zulassen, legen sie doch zusammen mit den bekannten Unterschieden zwischen den Geschlechtern im cholinergen System und bei AD nahe, dass AChE-I einen unterschiedlichen Einfluss bei Männern und Frauen auf Thrombozyten haben und auch periphere cholinerge Systeme beeinflusst.

Ferretti et al. fassen in einem Review die Studienlage zu geschlechterspezifischen klinischen Manifestationen, aber auch Biomarkern und Behandlung der AD zusammen. Sie konstatieren einen Mangel an Untersuchungen, die sich speziell mit den Unterschieden zwischen Männern und Frauen unter AChE-I-Therapie beschäftigen³¹⁴. Es zeigt sich, dass vor allem Frauen mit MCI von einer Rivastigmintherapie insofern profitieren, dass die Progression zur manifesten AD durch die Therapie verzögert werden kann³¹⁵. Diese Studie kommt durch retrograde statistische Modellierung zu genanntem Ergebnis, allerdings fehlen hierzu prospektive Studien. Auch bei AD zeigt eine Studie von Scacchi et al. eine verringerte Verschlechterung unter AChE-I-Therapie (Donepezil und Rivastigmin) bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Patienten³¹⁶. Allerdings sind die Ergebnisse kontrovers und nur wenige Studien untersuchen den Effekt des Geschlechts auf den Therapieverlauf^{314, 316, 317}. Ein Erklärungsansatz bringt den Östrogenrezeptor ins Spiel: Er vermittelt möglicherweise durch eine Aktivierung mit Östrogen eine Aktivitätserhöhung der Cholinacetyltransferase, die daraufhin mehr ACh synthetisiert³¹⁸. Hierbei scheint vor allem das Östrogenrezeptor-Allel P und Y weniger kognitive Verschlechterung unter AChE-I-Therapie aufzuweisen, als bei Patienten ohne dieses Allel³¹⁶.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass sowohl in der Thrombozytenaktivierung als auch in erythrozytären Indizes Unterschiede in der Entwicklung unter AChE-I-Therapie vorliegen, die in dieser Form zuvor noch nicht untersucht worden sind. Die erarbeiteten Ergebnisse legen nahe, dass sich diese Unterschiede zwischen den Geschlechtern im cholinergen System und bei AD, sowie in der AD-Therapie auf das periphere cholinerge System und die Thrombozytenfunktion übertragen lassen könnten. Weiterhin unterstützen die

Ergebnisse die Forderung nach weiterer geschlechterspezifischer Forschung für die AD und ihre Therapie.

4.7 Medikamentenprofil

Da zahlreiche Medikamente einen Einfluss auf die thrombozytäre Funktionsweise haben und sich in einer Studienpopulation von Alzheimer-Patienten zwangsläufig ältere Patienten unter Medikation befinden, wurde ein Medikamentenprofil der einzelnen Studienteilnehmer erstellt und mit Häufigkeiten den gesunden Kontrollen gegenüber gestellt (Tabelle 18). Die Thrombozytenaggregationshemmer ASS und Clopidogrel wurden 7-10 Tage vor Blutentnahme abgesetzt, um eine unverfälschte Messung zu gewährleisten. Andere Medikamente konnten nicht vertretbar abgesetzt werden, deshalb soll hier kurz auf mögliche Interaktionen mit der Plättchenaggregation eingegangen werden. 35% der AD-Patienten hatten einen Beta-Blocker in ihrer Medikation. Bekannt ist, dass die Beta-Blocker Propranolol, Nebivolol und Pindolol eine abnormale Plättchenaggregation, Atenolol eine erhöhte Plättchenaggregation hervorrufen³¹⁹. Bei Metoprolol sind keine Wechselwirkungen bekannt³¹⁹, der in dieser Studienpopulation neben Bisoprolol am häufigsten eingesetzte Beta-Rezeptorblocker war. Auch Angiotensinrezeptor-Blocker und ACE-Hemmer haben möglicherweise einen Einfluss auf die Plättchenaggregation, genauso wie die HMG-CoA-Reduktase Hemmer, Statine, eine abnorme Plättchenaggregation hervorrufen können³¹⁹. In dieser Studie waren die Einnahmequoten von Statinen in beiden Gruppen (AD und KO) relativ ähnlich verteilt (28% vs. 24%), wobei in der Gruppe der AD-Patienten mehr ACE-Hemmer/Sartane eingenommen wurden (33% vs. 21%) (Tabelle 18). Eine weitere Gruppe an Pharmaka, die die Thrombozytenfunktion beeinflusst, sind psychotrope Substanzen wie trizyklische Antidepressiva (TAD) und selektive Serotoninwiederaufnahme-Hemmer (SSRI)³¹⁹. Auch hier war die Einnahme dieser Substanzen unter den Studienteilnehmern unterschiedlich verteilt (35% vs. 21%).

Tabelle 18 – Medikamentenprofil der Studienteilnehmer (40 AD, 29 KO).

Medikamentengruppe	Untergruppe	AD (%)	KO (%)
Thrombozytenaggregationshemmer		10 (25)	4 (14)
Antikoagulation (Faktor Xa-Hemmung)		2 (5)	3 (10)
Kardiovaskuläre Medikamente	Beta-Blocker	14 (35)	7 (24)
	Ca-Kanal-Blocker	3 (8)	2 (7)
	ACE-Hemmer/Sartane	13 (33)	6 (21)
	Diuretika	6 (15)	1 (3)
Lipidsenker	Statine	11 (28)	7 (24)
Stoffwechselmedikamente	Diabetes	2 (5)	0 (0)
	Schilddrüse	6 (15)	4 (14)
Gichtmedikation		2 (5)	2 (7)
Protonenpumpeninhibitoren		3 (8)	3 (10)
Schmerzmedikamente		1 (3)	2 (7)
Vitamine	B12	2 (5)	0 (0)
	D	4 (10)	1 (3)
Pflanzliche Medikation		4 (10)	0 (0)
Antipsychotika/Antidepressiva/ Z-Substanzen		14 (35)	6 (21)
Sonstiges		4 (10)	2 (7)

AD, Alzheimer-Patienten; KO, Gesunde Kontrollen

Abschließend lässt sich zusammen fassen, dass die Thrombozytenfunktion sehr empfindlich gegenüber vielerlei Einflüssen, sowohl mechanischer³²⁰ als auch medikamentöser Natur ist³¹⁹. Sogar Nahrungsbestandteile und damit auch Vitamine und Gewürze scheinen die Thrombozytenfunktion zu beeinflussen^{319, 321}, sodass es kaum möglich ist, eine Studienpopulation aus Alzheimer-Patienten in höherem Alter zu generieren, bei der es keine Interaktionen durch Medikamente oder Lebensstil gibt. In Anbetracht der Komplexität der Interaktionen und vieler offener Fragen in diesem Bereich der Wissenschaft, ist es unmöglich für alle Einflüsse, die die Thrombozytenfunktion verändern, zu kontrollieren.

4.8 Fazit und Ausblick

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenaggregation und -degranulation in vivo entgegen der Erwartung eines pro-thrombotischen Zustandes der Thrombozyten von Alzheimer-Patienten bei unbehandelten AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit gleichen Lebensumständen erniedrigt ist. Erstmals wurde in der gleichen Kohorte nicht nur der Unterschied in der Plättchenaktivierung von unbehandelten Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen untersucht, sondern auch nach verschiedenen Zeitintervallen unter einer AChE-I-Therapie. Diese Untersuchung liefert ein umfassendes Bild über die Thrombozytenaktivierung in Plättchenaggregation und -degranulation, sowie den inflammatorischen Status der AD-Patienten und Eigenschaften verschiedener Parameter des Blutbildes im Verlauf der Therapie. Es liegt in der Natur einer Observations-Studie, dass für die beobachteten Ergebnisse keine Rückschlüsse über eine bestehende Kausalität gezogen werden können, jedoch ergeben sich interessante Hinweise für das Verhalten der Thrombozyten bei Alzheimer-Patienten und unter AChE-I Therapie. Die Zusammenhänge mit den verschiedenen, oben diskutierten Hypothesen und Theorien in der Verbindung mit $A\beta$ und Membranphospholipiden und -enzymen sollten in zukünftigen Studien im unmittelbaren Zusammenhang mit der Thrombozytenfunktion untersucht werden. So wäre der periphere $A\beta$ -Spiegel zu verschiedenen Therapiezeitpunkten sowie die Messung der Membranfluidität und Aktivität membranständiger Enzyme auch unter AChE-I Therapie ein relevanter Ansatz für eine umfassende pathophysiologische Einordnung dieser Ergebnisse. Ebenso wäre auch die Messung der APP-spaltenden Enzyme in den Thrombozyten und die Korrelation mit der Thrombozytenfunktion zu verschiedenen AChE-I-Therapiezeitpunkten interessant. Zimmermann et al. untersuchten die Veränderungen der APP-Prozessierung unter AChE-I-Therapie und fanden eine verstärkte Prozessierung im nicht-amyloidogenen Weg mittels α -Sekretase³²². Da die Verteilung dieser Enzyme auch für die Membranfluidität und damit für Plättchenfunktion und -aktivierung relevant sind, sollte diesem Feld in zukünftigen Untersuchungen besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass die Behandlung mit dem AChE-I Rivastigmin die Aggregation und Degranulation der Thrombozyten von AD-Erkrankten nach einer sechsmonatigen Therapie senkt. Dies steht im Kontrast zur Hypothese über die Funktion des nAChR $\alpha 7$ in Thrombozyten von Schedel et al., dass ACh über

autokrine und parakrine Mechanismen am nAChR $\alpha 7$ die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt¹¹⁴. Es bleibt zu klären, wie der initiale Anstieg bis zu einem Zeitpunkt von wenigen Monaten Therapie zu erklären ist.

Als klinische Implikation muss in weiteren Untersuchungen der Effekt der AChE-I zur verstärkenden Thrombozytenaggregationshemmung sowie Nebeneffekte geprüft werden. In einem Review von Monacelli et al. zeigt sich eine kardioprotektive Wirkung von AChE-I³²³. Darüber hinaus zeigte sich eine Symptomverbesserung bei Patienten mit vaskulärer Demenz unter Behandlung mit AChE-I³²⁴. Dies deutet darauf hin, dass die Diagnose der AD möglicherweise zu artifiziell klassifiziert wird, bzw. wirft die Frage auf, wie vaskuläre Demenzen, sowie Mischformen aus AD und vaskulärer Demenz besser klassifiziert werden könnten. Sie teilen gemeinsame Risikofaktoren³²⁵ und möglicherweise könnten Thrombozyten zum besseren Verständnis, aber auch der besseren Abgrenzung der Krankheitsbilder führen. Die Besonderheit von Rivastigmin, sowohl die BuChE als auch die AChE zu hemmen, macht diesen AChE-I besonders interessant für ein erweitertes Indikationsgebiet um die vaskulären Demenzen (reviewed in Kandiah et al.³²⁶). Ebenfalls kann der Einsatz der AChE-I bei Alzheimer-Patienten durch die den Parasympathikus verstärkenden Effekte³²⁷ und die zahlreichen Wirkungsweisen der AChE¹³⁰ möglicherweise zu einer Verringerung der bei AD-Patienten oft vorherrschenden Polypharmazie dienen³²⁷.

Das inflammatorische Niveau der AD-Patienten ist vor allem in Form des IL-1 β erhöht. Entgegen der Erwartungen der anti-inflammatorischen Wirkung sinkt der IL-1 β Spiegel unter AChE-I Therapie nicht ab. IL-1 β hält möglicherweise die pathophysiologischen Mechanismen der AD aufrecht bzw. stellt einen natürlichen Kompensationsmechanismus dar. Die Rolle des Zytokins in der Peripherie sowohl in seiner Wirkung auf die Thrombozyten als auch im AD-Gehirn sollte genauer untersucht werden, vor allem hinsichtlich seines Einflusses auf den Krankheitsbeginn und die -progression. Weiterhin sollte geklärt werden, ob und in welchem Umfang AChE-I möglicherweise doch in der Lage sind, die IL-1 β Produktion zu hemmen und welche Rolle der cholinerge antiinflammatorische Weg über den nAChR $\alpha 7$ auch in Thrombozyten spielt.

Diese Studie ergab ebenfalls zahlreiche Veränderungen des Blutbildes bei AD-Patienten, die sich über die Therapie mit AChE-I verändern. Die erniedrigte Plättchenzahl sowie der Thrombokrit geben Hinweise auf die pathophysiologischen

Veränderungen der AD, die auch extraneuronal im Blut vertreten sind. Allerdings bleibt in dieser Untersuchung offen, wie die Verringerung der Plättchenzahl begründet ist. Hier wären Untersuchungen der Thrombopoese und Megakaryozyten von AD-Patienten und Kontrollen sowie im Therapieverlauf mit AChE-I von Relevanz, die Auskünfte über den Entstehungsort der Veränderungen geben könnten.

Auch die Ursachen der veränderten Erythrozytenindizes sind durch weitere Untersuchungen zu klären. So scheint in dieser Untersuchung die AChE-I-Therapie ein Ansteigen des MCH und MCHC unter AD-Patienten zu bewirken. Die Kausalität dieser Beobachtung ist allerdings noch durch randomisierte kontrollierte Studien zu klären. Die Veränderungen von Erythrozytenindizes könnten Aufschluss über die cholinerge Wirkung auf Erythrozyten geben, ebenso könnte durch Untersuchung einer möglichen Korrelation mit der kognitiven Leistungsfähigkeit ein potenzieller Marker für das Therapieansprechen entwickelt werden.

In diesem Zusammenhang sind vor allem Forschungsansätze weiter zu verfolgen, die eine Aufschlüsselung der Effekte von AChE-I-Therapie auf das Geschlecht berücksichtigen, da sich eindeutige Unterschiede im cholinergen System von Männern und Frauen zeigen. Dies spiegelt sich in den Veränderungen der Erythrozytenindizes in dieser Untersuchung wider, die zeigt, dass insbesondere die Veränderungen des MCHC auf männliche Studienteilnehmer begrenzt ist.

Die Ergebnisse dieser Studie sind vor allem limitiert durch die begrenzte Zahl an Studienteilnehmern. Weiterhin schlussfolgert die S3-Leitlinie zur AD von 2016, dass die Überlegenheit der AChE-I gegenüber Placebo in Studien ab einer Einsatzdauer von 24 Wochen getestet ist¹²⁴. Dies zeigt, dass die eigentlichen Effekte auf die Kognition und möglicherweise auch auf Thrombozyten erst ab einer längeren Behandlungsdauer, als in dieser Erhebung erfasst, zu zeigen sind. Zwar sind in dieser Studie Patienten mit Behandlungsdauer von sechs Monaten untersucht worden, jedoch ist die Anzahl aufgrund einer hohen Drop-out-Rate begrenzt und es konnten in der Langzeittherapiegruppe (sechs Monate AChE-I) nur noch 6 Patienten untersucht werden.

Außerdem erhielten Patienten in dieser Zeit ausschließlich den AChE-I Rivastigmin, der sowohl BuChE, als auch AChE hemmt. Vor allem bei der Frage nach Wirkungen der AChE-Ist, die nicht auf das katalytische Zentrum begrenzt sind, wurde in anderen Erhebungen vor allem Donepezil untersucht, sodass davon ausgegangen werden

kann, dass unterschiedliche AChE-I sich auch in ihrer nicht-katalytischen Wirkung unterscheiden.

Thrombozyten und rote Blutkörperchen mit ihren Veränderungen in verschiedenen Eigenschaften werden als potentielle Biomarker für Alzheimer propagiert²⁵³, allerdings sind die Ergebnisse inkonsistent und die Vielfalt an thrombozytären Markern wurde bisher nicht in ein und derselben Population gemessen. In konsekutiven Untersuchungen der Arbeitsgruppe gelang es, unter Einbezug von Parametern der in dieser Dissertation erarbeiteten Unterschiede zwischen Aggregations- und Degranulationsverhalten in Kombination mit der veränderten Thrombozytenform und Expression verschiedener Transmembranproteine und Rezeptoren (Caveolin, nAChR $\alpha 7$), sowie mikro-RNA, ein multivariates Modell zu erarbeiten, das erstmals basierend auf Thrombozytenveränderungen AD-Patienten von gesunden Kontrollen zu unterscheiden vermag³²⁸. Dieses Modell ergab eine Sensitivität von 96,6% und Spezifität von 80% mit einem positiven prädiktiven Wert von 89,3%³²⁸. Es konnte somit gezeigt werden, dass ein umfangreiches Thrombozytenprofil als Biomarker für die AD-Diagnostik dienen kann. Da Thrombozyten leicht und mit wenig Unannehmlichkeiten für den Patienten zu gewinnen sind konnte ein vielversprechender Ansatz geschaffen werden. Die beste Auswahl der geeigneten Parameter kann zusätzlich durch besseres pathophysiologisches Verständnis der thrombozytären Veränderungen über mögliche weitere Forschungsgebiete verbessert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Thrombozyten weisen als im Blut zirkulierende Zellen des Blutes zahlreiche Ähnlichkeiten mit neuronalen Zellen auf. Das Vorkommen des Amyloidvorläuferproteins, aller es spaltenden Enzyme und des Amyloid β , machen sie interessant für das bessere Verständnis der Alzheimer-Pathophysiologie, der Alzheimer-Diagnostik und der Studie von Alzheimer-Medikamenten. Bisher sind diverse thrombozytäre Veränderungen bei Alzheimer-Patienten und im Tiermodell untersucht worden, jedoch waren diese Untersuchungen zur Thrombozytenfunktion meist auf einzelne Marker beschränkt und die Ergebnisse sehr kontrovers. Weiterhin weisen Thrombozyten auch Acetylcholin-Rezeptoren auf, sodass ein Einfluss anticholinergischer Alzheimer-Medikation auf die Thrombozytenfunktion nahe liegt aber bisher nicht umfassend untersucht ist. Deshalb wird in dieser Dissertation der Frage nachgegangen, ob die Thrombozytenfunktion von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen Alterationen aufweist und wie sich die Thrombozytenfunktion unter Acetylcholinesterase- Inhibitor-Therapie verhält.

Die Thrombozytenaggregation wurde mittels Multiplate-Impedanzaggregometrie unter Stimulation mit Arachidonsäure, Adenosindiphosphat und dem Thromboxanrezeptoragonisten U46619 gemessen. Durchflusszytometrisch wurden zusätzlich die Degranulationsmarker CD62P und CD63, sowie die Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors bestimmt. Mithilfe von ELISAs und Cytometric Bead arrays wurde das inflammatorische Niveau mit den Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF α gemessen. Diese Messungen erfolgten zunächst bei unbehandelten Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen, die in Alter und Umweltfaktoren zu den Alzheimer-Patienten passten und aus ihren Lebenspartnern rekrutiert wurden. Nach Einnahme des Acetylcholinesterase-Inhibitors Rivastigmin für einen Zeitraum von einem, drei und sechs Monaten Therapie wurden die gleichen Messungen wiederholt.

Die Thrombozytenaggregation zeigte sich bei Alzheimer-Patienten erniedrigt (unter Stimulation mit Arachidonsäure und Adenosindiphosphat) im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ebenfalls war die Expression der Degranulationsmarker (CD62P) bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt. Auch im Blutbild zeigten sich Veränderungen: So wiesen Alzheimer-Patienten geringere Thrombozytenzahlen auf, als gesunde Kontrollen. Das IL-1 β -Niveau war im Vergleich

zu gesunden Kontrollen erhöht. Unter Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie sanken Aggregation und die Degranulation weiter ab. Diese Ergebnisse liefern ein umfassendes Thrombozytenprofil aus Aktivierung mit Aggregation und Degranulation sowie inflammatorischen Markern und dem Blutbild, was bisher in diesem Umfang nicht in derselben Kohorte untersucht wurde. Dabei wird die kontroverse Literatur um sowohl eine Querschnittsanalyse (unbehandelte Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen) als auch eine longitudinale Untersuchung der Entwicklung dieser Parameter unter Acetylcholinesterase-Inhibitor-Therapie ergänzt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind insofern limitiert, als dass die Patientenzahl klein (n=40, in den Verlaufsgruppen noch geringer) ist und größere Studien zur besseren statistischen Power durchgeführt werden müssten. Allerdings unterliegt dies bei Thrombozyten Untersuchungen stets der Schwierigkeit, ein Patientenkollektiv zu rekrutieren, was keine verfälschende Medikation einnimmt. Dies stellt bei dem oft fortgeschrittenen Alter von Alzheimer-Patienten und ihren Komorbiditäten eine der größten Schwierigkeiten dieser Analysen dar.

In auf dieser Arbeit aufbauenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein multivariates Modell aus thrombozytären Veränderungen zwischen Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen unterscheiden kann und somit die Kriterien eines Biomarkers erfüllt. Weitere und größere Untersuchungen zum besseren pathophysiologischen Verständnis der Rolle von Thrombozyten bei der Alzheimer-Erkrankung sind notwendig, um ihr Potential als diagnostischer oder prognostischer Biomarker festzulegen und zu nutzen. Dabei sollte, wie in dieser Arbeit diskutiert, besonderes Augenmerk auf die Veränderung der thrombozytären Membranen, ihrer Fluidität, und den Eigenschaften des Amyloidvorläuferproteins, der Phospholipase A2 sowie des Amyloid β und neurofibrillären Bündel gelegt werden.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit nicht nur gezeigt, dass die Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat, sondern auch ein geschlechterspezifischer Effekt herausgearbeitet. Somit bilden Thrombozyten auch für die weitere Erforschung der symptomverbessernden Rolle der Acetylcholinesterase-Inhibitoren einen viel versprechenden Forschungsansatz. Ebenso kann der Thrombozyt als Modelzelle einen Beitrag in der weiteren Untersuchung von krankheitsbeeinflussenden Wirkungen der Acetylcholinesterase-Inhibitoren leisten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Ferri, CP, Prince, M, Brayne, C, Brodaty, H, Fratiglioni, L, Ganguli, M, Hall, K, Hasegawa, K, Hendrie, H, Huang, Y, Jorm, A, Mathers, C, Menezes, PR, Rimmer, E, Sczufca, M: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet (London, England)*, 366: 2112-2117, 2005.
2. Hacke, W, Poeck, K: *Neurologie*, Springer, 2010.
3. Alzheimer Forschung Initiative e.V.: „*Ich habe mich sozusagen verloren*“. *Die Geschichte der Alzheimer-Krankheit*. 2019. Online: <https://www.alzheimerforschung.de/alzheimer/wasistalzheimer/geschichte-alzheimer-krankheit/>, Stand: 2018.
4. Hampel, H, Mesulam, MM, Cuello, AC, Khachaturian, AS, Vergallo, A, Farlow, MR, Snyder, PJ, Giacobini, E, Khachaturian, ZS: Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, 6: 2-15, 2019.
5. Khachaturian, ZS, Khachaturian, AS: The Paradox of Research on Dementia-Alzheimer's Disease. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, 3: 189-191, 2016.
6. Humpel, C: Platelets: Their Potential Contribution to the Generation of Beta-amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Current neurovascular research*, 14: 290-298, 2017.
7. Prince, M, Wimo, A, Guerchet, M, Ali, G, Wu, Y, Prina, M: World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International. *Alzheimer's Disease International (ADI)*, London, 2015.
8. Zhang, W, Huang, W, Jing, F: Contribution of blood platelets to vascular pathology in Alzheimer's disease. *Journal of blood medicine*, 4: 141-147, 2013.
9. Bagyinszky, E, Giau, VV, Shim, K, Suk, K, An, SSA, Kim, S: Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis. *Journal of the neurological sciences*, 376: 242-254, 2017.
10. Sadowski, M, Pankiewicz, J, Scholtzova, H, Li, YS, Quartermain, D, Duff, K, Wisniewski, T: Links between the pathology of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochemical research*, 29: 1257-1266, 2004.
11. Tellechea, P, Pujol, N, Esteve-Belloch, P, Echeveste, B, Garcia-Eulate, MR, Arbizu, J, Riverol, M: Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 33: 244-253, 2018.
12. Bird, TD: Alzheimer disease overview. In: *GeneReviews*@[Internet]. University of Washington, Seattle, 2015.
13. Alonso Vilatela, ME, Lopez-Lopez, M, Yescas-Gomez, P: Genetics of Alzheimer's disease. *Archives of medical research*, 43: 622-631, 2012.

14. Kamboh, MI: Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet*, 68: 381-404, 2004.
15. Association, As: 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 14: 367-429, 2018.
16. Zhao, L, Woody, SK, Chhibber, A: Estrogen receptor beta in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics. *Ageing research reviews*, 24: 178-190, 2015.
17. Corder, EH, Saunders, AM, Strittmatter, WJ, Schmechel, DE, Gaskell, PC, Small, GW, Roses, AD, Haines, JL, Pericak-Vance, MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261: 921-923, 1993.
18. Saunders, AM, Strittmatter, WJ, Schmechel, D, George-Hyslop, PS, Pericak-Vance, MA, Joo, S, Rosi, B, Gusella, J, Crapper-MacLachlan, D, Alberts, M: Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43: 1467-1467, 1993.
19. Verghese, PB, Castellano, JM, Holtzman, DM: Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *The Lancet Neurology*, 10: 241-252, 2011.
20. Theendakara, V, Peters-Libeu, CA, Bredesen, DE, Rao, RV: Transcriptional Effects of ApoE4: Relevance to Alzheimer's Disease. *Molecular neurobiology*, 55: 5243-5254, 2018.
21. Tiraboschi, P, Hansen, LA, Masliah, E, Alford, M, Thal, LJ, Corey-Bloom, J: Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology*, 62: 1977-1983, 2004.
22. Xu, W, Tan, L, Wang, HF, Tan, MS, Tan, L, Li, JQ, Zhao, QF, Yu, JT: Education and Risk of Dementia: Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Molecular neurobiology*, 53: 3113-3123, 2016.
23. Mendez, MF: Early-onset Alzheimer Disease and Its Variants. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 25: 34-51, 2019.
24. Tentolouris-Piperas, V, Ryan, NS, Thomas, DL, Kinnunen, KM: Brain imaging evidence of early involvement of subcortical regions in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Brain research*, 1655: 23-32, 2017.
25. Raslau, FD, Mark, IT, Klein, AP, Ulmer, JL, Mathews, V, Mark, LP: Memory part 2: the role of the medial temporal lobe. *AJNR American journal of neuroradiology*, 36: 846-849, 2015.
26. Rajasekhar, K, Chakrabarti, M, Govindaraju, T: Function and toxicity of amyloid beta and recent therapeutic interventions targeting amyloid beta in Alzheimer's disease. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 51: 13434-13450, 2015.
27. Bredesen, DE: Metabolic profiling distinguishes three subtypes of Alzheimer's disease. *Aging*, 7: 595-600, 2015.

28. Lu, JX, Qiang, W, Yau, WM, Schwieters, CD, Meredith, SC, Tycko, R: Molecular structure of beta-amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*, 154: 1257-1268, 2013.
29. Selkoe, DJ, Hardy, J: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8: 595-608, 2016.
30. Conicella, AE, Fawzi, NL: The C-terminal threonine of Abeta43 nucleates toxic aggregation via structural and dynamical changes in monomers and protofibrils. *Biochemistry*, 53: 3095-3105, 2014.
31. Hard, T: Amyloid Fibrils: Formation, Polymorphism, and Inhibition. *The journal of physical chemistry letters*, 5: 607-614, 2014.
32. Jucker, M, Walker, LC: Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of neurology*, 70: 532-540, 2011.
33. Kaye, R, Head, E, Thompson, JL, McIntire, TM, Milton, SC, Cotman, CW, Glabe, CG: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300: 486-489, 2003.
34. Hane, FT, Lee, BY, Leonenko, Z: Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *J Alzheimers Dis*, 57: 1-28, 2017.
35. Di Luca, M, Colciaghi, F, Pastorino, L, Borroni, B, Padovani, A, Cattabeni, F: Platelets as a peripheral district where to study pathogenetic mechanisms of alzheimer disease: the case of amyloid precursor protein. *European journal of pharmacology*, 405: 277-283, 2000.
36. Potter, H, Granic, A, Caneus, J: Role of Trisomy 21 Mosaicism in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research*, 13: 7-17, 2016.
37. Lott, IT, Head, E: Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nature reviews Neurology*, 15: 135-147, 2019.
38. Talib, LL, Joaquim, HP, Forlenza, OV: Platelet biomarkers in Alzheimer's disease. *World journal of psychiatry*, 2: 95-101, 2012.
39. Kucheryavykh, LY, Davila-Rodriguez, J, Rivera-Aponte, DE, Zueva, LV, Washington, AV, Sanabria, P, Inyushin, MY: Platelets are responsible for the accumulation of beta-amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis. *Brain research bulletin*, 128: 98-105, 2017.
40. Atwood, CS, Perry, G, Smith, MA: Cerebral hemorrhage and amyloid-beta. *Science*, 299: 1014; author reply 1014, 2003.
41. Hardy, J: Does Abeta 42 have a function related to blood homeostasis? *Neurochemical research*, 32: 833-835, 2007.
42. Pearson, HA, Peers, C: Physiological roles for amyloid beta peptides. *The Journal of physiology*, 575: 5-10, 2006.

43. Puzzo, D, Arancio, O: Amyloid-beta peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1: S111-120, 2013.
44. Mattson, MP, Cheng, B, Culwell, AR, Esch, FS, Lieberburg, I, Rydel, RE: Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*, 10: 243-254, 1993.
45. Hesse, L, Beher, D, Masters, CL, Multhaup, G: The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS letters*, 349: 109-116, 1994.
46. Saitoh, T, Sundsmo, M, Roch, JM, Kimura, N, Cole, G, Schubert, D, Oltersdorf, T, Schenk, DB: Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*, 58: 615-622, 1989.
47. Barrett, PJ, Song, Y, Van Horn, WD, Hustedt, EJ, Schafer, JM, Hadziselimovic, A, Beel, AJ, Sanders, CR: The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*, 336: 1168-1171, 2012.
48. Lacor, PN, Buniel, MC, Chang, L, Fernandez, SJ, Gong, Y, Viola, KL, Lambert, MP, Velasco, PT, Bigio, EH, Finch, CE, Krafft, GA, Klein, WL: Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24: 10191-10200, 2004.
49. Hyman, BT, Phelps, CH, Beach, TG, Bigio, EH, Cairns, NJ, Carrillo, MC, Dickson, DW, Duyckaerts, C, Frosch, MP, Masliah, E, Mirra, SS, Nelson, PT, Schneider, JA, Thal, DR, Thies, B, Trojanowski, JQ, Vinters, HV, Montine, TJ: National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 8: 1-13, 2012.
50. Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K, George, L, Tung, YC, Kim, KS, Wisniewski, HM: Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 2853-2857, 1989.
51. Lai, AY, McLaurin, J: Mechanisms of amyloid-Beta Peptide uptake by neurons: the role of lipid rafts and lipid raft-associated proteins. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011: 548380, 2010.
52. Ma, KG, Qian, YH: Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 73: 96-106, 2019.
53. Umeda, T, Tomiyama, T, Sakama, N, Tanaka, S, Lambert, MP, Klein, WL, Mori, H: Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *Journal of neuroscience research*, 89: 1031-1042, 2011.
54. Koo, EH, Squazzo, SL: Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269: 17386-17389, 1994.
55. Wegiel, J, Kuchna, I, Nowicki, K, Frackowiak, J, Mazur-Kolecka, B, Imaki, H, Wegiel, J, Mehta, PD, Silverman, WP, Reisberg, B, DeLeon, M, Wisniewski, T, Pirtilla, T, Frey, H, Lehtimaki, T, Kivimaki, T, Visser, FE, Kamphorst, W,

- Potempska, A, Bolton, D, Currie, JR, Miller, DL: Intraneuronal Abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta neuropathologica*, 113: 389-402, 2007.
56. Dafnis, I, Stratikos, E, Tzinia, A, Tsilibary, EC, Zannis, VI, Chroni, A: An apolipoprotein E4 fragment can promote intracellular accumulation of amyloid peptide beta 42. *Journal of neurochemistry*, 115: 873-884, 2010.
57. Buckingham, SD, Jones, AK, Brown, LA, Sattelle, DB: Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacological reviews*, 61: 39-61, 2009.
58. Song, F, Poljak, A, Valenzuela, M, Mayeux, R, Smythe, GA, Sachdev, PS: Meta-analysis of plasma amyloid-beta levels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 26: 365-375, 2011.
59. Hane, FT, Robinson, M, Lee, BY, Bai, O, Leonenko, Z, Albert, MS: Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *J Alzheimers Dis*, 57: 645-665, 2017.
60. Doody, RS, Thomas, RG, Farlow, M, Iwatsubo, T, Vellas, B, Joffe, S, Kieburtz, K, Raman, R, Sun, X, Aisen, PS, Siemers, E, Liu-Seifert, H, Mohs, R: Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 370: 311-321, 2014.
61. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, D: *Phase-III-Studien zu Aducanumab abgebrochen*. Online: <https://www.dgn.org/presse/pressemitteilungen/56-pressemitteilung-2018/3746-phase-iii-studien-zu-aducanumab-abgebrochen>, Stand: 22.03.2019.
62. Panza, F, Lozupone, M, Dibello, V, Greco, A, Daniele, A, Seripa, D, Logroscino, G, Imbimbo, BP: Are antibodies directed against amyloid-beta (Abeta) oligomers the last call for the Abeta hypothesis of Alzheimer's disease? *Immunotherapy*, 11: 3-6, 2019.
63. Mukrasch, MD, Bibow, S, Korukottu, J, Jeganathan, S, Biernat, J, Griesinger, C, Mandelkow, E, Zweckstetter, M: Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS biology*, 7: e34, 2009.
64. Jadhav, S, Katina, S, Kovac, A, Kazmerova, Z, Novak, M, Zilka, N: Truncated tau deregulates synaptic markers in rat model for human tauopathy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9: 24, 2015.
65. Ittner, LM, Ke, YD, Delerue, F, Bi, M, Gladbach, A, van Eersel, J, Wolfing, H, Chieng, BC, Christie, MJ, Napier, IA, Eckert, A, Staufenbiel, M, Hardeman, E, Gotz, J: Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142: 387-397, 2010.
66. Wu, XL, Pina-Crespo, J, Zhang, YW, Chen, XC, Xu, HX: Tau-mediated Neurodegeneration and Potential Implications in Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. *Chinese medical journal*, 130: 2978-2990, 2017.

67. Champ, PC, Maurice, S, Vargason, JM, Camp, T, Ho, PS: Distributions of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation. *Nucleic acids research*, 32: 6501-6510, 2004.
68. Violet, M, Delattre, L, Tardivel, M, Sultan, A, Chauderlier, A, Caillierez, R, Talahari, S, Nessler, F, Lefebvre, B, Bonnefoy, E, Buee, L, Galas, MC: A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8: 84, 2014.
69. Vasudevaraju, P, Guerrero, E, Hegde, ML, Collen, TB, Britton, GB, Rao, KS: New evidence on alpha-synuclein and Tau binding to conformation and sequence specific GC* rich DNA: Relevance to neurological disorders. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4: 112-117, 2012.
70. Leyns, CEG, Holtzman, DM: Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Molecular neurodegeneration*, 12: 50, 2017.
71. Yamada, K, Cirrito, JR, Stewart, FR, Jiang, H, Finn, MB, Holmes, BB, Binder, LI, Mandelkow, EM, Diamond, MI, Lee, VM, Holtzman, DM: In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31: 13110-13117, 2011.
72. Racchi, M, Govoni, S: The pharmacology of amyloid precursor protein processing. *Experimental gerontology*, 38: 145-157, 2003.
73. Giacobini, E, Gold, G: Alzheimer disease therapy--moving from amyloid-beta to tau. *Nature reviews Neurology*, 9: 677-686, 2013.
74. Desikan, RS, McEvoy, LK, Thompson, WK, Holland, D, Brewer, JB, Aisen, PS, Sperling, RA, Dale, AM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, et al: Amyloid- β -Associated Clinical Decline Occurs Only in the Presence of Elevated P-tauA β -Associated Clinical Decline and Elevated P-tau. *Archives of neurology*, 69: 709-713, 2012.
75. Rapoport, M, Dawson, HN, Binder, LI, Vitek, MP, Ferreira, A: Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 6364-6369, 2002.
76. Martin, L, Latypova, X, Terro, F: Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*, 58: 458-471, 2011.
77. Khatoon, S, Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K: Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *Journal of neurochemistry*, 59: 750-753, 1992.
78. Spires-Jones, TL, Hyman, BT: The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 82: 756-771, 2014.
79. Schneider, A, Biernat, J, von Bergen, M, Mandelkow, E, Mandelkow, EM: Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also

- protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, 38: 3549-3558, 1999.
80. Amadoro, G, Ciotti, MT, Costanzi, M, Cestari, V, Calissano, P, Canu, N: NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 2892-2897, 2006.
81. DuBoff, B, Gotz, J, Feany, MB: Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron*, 75: 618-632, 2012.
82. He, HJ, Wang, XS, Pan, R, Wang, DL, Liu, MN, He, RQ: The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC cell biology*, 10: 81, 2009.
83. Banks, WA, Kovac, A, Majerova, P, Bullock, KM, Shi, M, Zhang, J: Tau Proteins Cross the Blood-Brain Barrier. *J Alzheimers Dis*, 55: 411-419, 2017.
84. Walsh, DM, Selkoe, DJ: A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nature reviews Neuroscience*, 17: 251-260, 2016.
85. Wessler, I, Kirkpatrick, C: Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*, 154: 1558-1571, 2008.
86. Newman, E, Gupta, K, Climer, J, Monaghan, C, Hasselmo, M: Cholinergic modulation of cognitive processing: insights drawn from computational models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 2012.
87. Zilles, K, Rehkämper, G: Transmitter und Rezeptoren. In: *Funktionelle Neuroanatomie*. Springer, 1993, pp 379-406.
88. Bartus, RT, Dean, RL, 3rd, Beer, B, Lippa, AS: The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217: 408-414, 1982.
89. Mesulam, M: Cholinergic aspects of aging and Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, 71: 760-761, 2012.
90. Minger, SL, Esiri, MM, McDonald, B, Keene, J, Carter, J, Hope, T, Francis, PT: Cholinergic deficits contribute to behavioral disturbance in patients with dementia. *Neurology*, 55: 1460-1467, 2000.
91. Coyle, JT, Price, DL, DeLong, MR: Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219: 1184-1190, 1983.
92. Trepel, M: *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, Elsevier, Urban & Fischer, 2012.
93. Parri, HR, Hernandez, CM, Dineley, KT: Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochemical pharmacology*, 82: 931-942, 2011.
94. Hasselmo, ME: Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends in cognitive sciences*, 3: 351-359, 1999.

95. Whitehouse, PJ, Price, DL, Struble, RG, Clark, AW, Coyle, JT, Delon, MR: Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215: 1237-1239, 1982.
96. Maurer, SV, Williams, CL: The Cholinergic System Modulates Memory and Hippocampal Plasticity via Its Interactions with Non-Neuronal Cells. *Frontiers in immunology*, 8: 1489, 2017.
97. Grothe, M, Heinsen, H, Teipel, SJ: Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, 71: 805-813, 2012.
98. Schliebs, R, Arendt, T: The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural brain research*, 221: 555-563, 2011.
99. Francis, PT, Palmer, AM, Snape, M, Wilcock, GK: The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-147, 1999.
100. Francis, PT, Palmer, AM, Sims, NR, Bowen, DM, Davison, AN, Esiri, MM, Neary, D, Snowden, JS, Wilcock, GK: Neurochemical studies of early-onset Alzheimer's disease. Possible influence on treatment. *N Engl J Med*, 313: 7-11, 1985.
101. Nitsch, RM, Slack, BE, Wurtman, RJ, Growdon, JH: Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, 258: 304-307, 1992.
102. Perry, EK, Kilford, L, Lees, AJ, Burn, DJ, Perry, RH: Increased Alzheimer pathology in Parkinson's disease related to antimuscarinic drugs. *Annals of neurology*, 54: 235-238, 2003.
103. Kihara, T, Shimohama, S, Sawada, H, Kimura, J, Kume, T, Kochiyama, H, Maeda, T, Akaike, A: Nicotinic receptor stimulation protects neurons against beta-amyloid toxicity. *Annals of neurology*, 42: 159-163, 1997.
104. Kelly, JF, Furukawa, K, Barger, SW, Rengen, MR, Mark, RJ, Blanc, EM, Roth, GS, Mattson, MP: Amyloid beta-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 6753-6758, 1996.
105. Auld, DS, Kar, S, Quirion, R: Beta-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *Trends in neurosciences*, 21: 43-49, 1998.
106. Mesulam, M: The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)*, 11: 43-49, 2004.
107. Beach, TG, Kuo, YM, Spiegel, K, Emmerling, MR, Sue, LI, Kokjohn, K, Roher, AE: The cholinergic deficit coincides with Abeta deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 59: 308-313, 2000.
108. Potter, PE, Rauschkolb, PK, Pandya, Y, Sue, LI, Sabbagh, MN, Walker, DG, Beach, TG: Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to

- amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 122: 49-60, 2011.
109. Lombardo, S, Maskos, U: Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, 96: 255-262, 2015.
110. Giacobini, E, DeSarno, P, McIlhany, M, Clark, B: The Cholinergic Receptor System in the Frontal Lobe of Alzheimer Patients. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 1988 pp 367-378.
111. Foucault-Fruchard, L, Antier, D: Therapeutic potential of alpha7 nicotinic receptor agonists to regulate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, 12: 1418-1421, 2017.
112. Zoli, M, Pucci, S, Vilella, A, Gotti, C: Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current neuropharmacology*, 16: 338-349, 2018.
113. Gotti, C, Clementi, F, Fornari, A, Gaimarri, A, Guiducci, S, Manfredi, I, Moretti, M, Pedrazzi, P, Pucci, L, Zoli, M: Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology*, 78: 703-711, 2009.
114. Schedel, A, Thornton, S, Schloss, P, Kluter, H, Bugert, P: Human platelets express functional alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31: 928-934, 2011.
115. Gotti, C, Fornasari, D, Clementi, F: Human neuronal nicotinic receptors. *Progress in neurobiology*, 53: 199-237, 1997.
116. Dominguez del Toro, E, Juiz, JM, Peng, X, Lindstrom, J, Criado, M: Immunocytochemical localization of the alpha 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 349: 325-342, 1994.
117. Wang, HY, Lee, DH, D'Andrea, MR, Peterson, PA, Shank, RP, Reitz, AB: beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem*, 275: 5626-5632, 2000.
118. Puzzo, D, Privitera, L, Leznik, E, Fa, M, Staniszewski, A, Palmeri, A, Arancio, O: Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28: 14537-14545, 2008.
119. Arora, K, Alfulaij, N, Higa, JK, Panee, J, Nichols, RA: Impact of sustained exposure to β -amyloid on calcium homeostasis and neuronal integrity in model nerve cell system expressing $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 288: 11175-11190, 2013.
120. Dougherty, JJ, Wu, J, Nichols, RA: Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23: 6740-6747, 2003.

121. Kihara, T, Shimohama, S, Sawada, H, Honda, K, Nakamizo, T, Shibasaki, H, Kume, T, Akaike, A: $\alpha 7$ nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A β -amyloid-induced neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 13541-13546, 2001.
122. Espinoza-Fonseca, LM: Base docking model of the homomeric alpha7 nicotinic receptor-beta-amyloid(1-42) complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 320: 587-591, 2004.
123. Lasala, M, Fabiani, C, Corradi, J, Antollini, S, Bouzat, C: Molecular Modulation of Human alpha7 Nicotinic Receptor by Amyloid-beta Peptides. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13: 37, 2019.
124. Deuschl, G, Maier, W, Jessen, F, Spottke, A: S3-Leitlinie Demenzen. 2016. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 1107 2016)*, 2016.
125. Doody, RS, Dunn, JK, Clark, CM, Farlow, M, Foster, NL, Liao, T, Gonzales, N, Lai, E, Massman, P: Chronic donepezil treatment is associated with slowed cognitive decline in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 12: 295-300, 2001.
126. Cavedo, E, Dubois, B, Colliot, O, Lista, S, Croisile, B, Tisserand, GL, Touchon, J, Bonafe, A, Ousset, PJ, Rouaud, O, Ricolfi, F, Vighetto, A, Pasquier, F, Galluzzi, S, Delmaire, C, Ceccaldi, M, Girard, N, Lehericy, S, Duveau, F, Chupin, M, Sarazin, M, Dormont, D, Hampel, H: Reduced Regional Cortical Thickness Rate of Change in Donepezil-Treated Subjects With Suspected Prodromal Alzheimer's Disease. *The Journal of clinical psychiatry*, 77: e1631-e1638, 2016.
127. Castro, A, Martinez, A: Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Current pharmaceutical design*, 12: 4377-4387, 2006.
128. Sarno, TA, Talib, LL, Joaquim, HP, Bram, JM, Gattaz, WF, Forlenza, OV: Protein Expression of BACE1 is Downregulated by Donepezil in Alzheimer's Disease Platelets. *J Alzheimers Dis*, 55: 1445-1451, 2017.
129. Inestrosa, NC, Alvarez, A, Perez, CA, Moreno, RD, Vicente, M, Linker, C, Casanueva, OI, Soto, C, Garrido, J: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16: 881-891, 1996.
130. Soreq, H, Seidman, S: Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature reviews Neuroscience*, 2: 294-302, 2001.
131. Wang, H, Zhang, H: Reconsideration of Anticholinesterase Therapeutic Strategies against Alzheimer's Disease. *ACS chemical neuroscience*, 2018.
132. Ponomarev, ED: Fresh Evidence for Platelets as Neuronal and Innate Immune Cells: Their Role in the Activation, Differentiation, and Deactivation of Th1, Th17, and Tregs during Tissue Inflammation. *Frontiers in immunology*, 9: 406, 2018.

133. Semple, JW, Italiano, JE, Jr., Freedman, J: Platelets and the immune continuum. *Nature reviews Immunology*, 11: 264-274, 2011.
134. Goubau, C, Buyse, GM, Di Michele, M, Van Geet, C, Freson, K: Regulated granule trafficking in platelets and neurons: a common molecular machinery. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 17: 117-125, 2013.
135. Pletscher, A: Platelets as models: use and limitations. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 44: 152-155, 1988.
136. Mercado, CP, Kilic, F: Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Molecular interventions*, 10: 231-241, 2010.
137. Fitch-Tewfik, JL, Flaumenhaft, R: Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells. *Frontiers in endocrinology*, 4: 77, 2013.
138. Kaneez, FS, Saeed, SA: Investigating GABA and its function in platelets as compared to neurons. *Platelets*, 20: 328-333, 2009.
139. Pellerin, D, Lortie, A, Corbin, F: Platelets as a surrogate disease model of neurodevelopmental disorders: Insights from Fragile X Syndrome. *Platelets*: 1-12, 2017.
140. Dityatev, A, Dityateva, G, Sytnyk, V, Dellling, M, Toni, N, Nikonenko, I, Muller, D, Schachner, M: Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24: 9372-9382, 2004.
141. Love, S, Miners, JS: Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 131: 645-658, 2016.
142. Gawaz, M, Stellos, K, Langer, HF: Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost*, 6: 235-242, 2008.
143. Laske, C, Sopova, K, Stellos, K: Platelet activation in Alzheimer's disease: from pathophysiology to clinical value. *Current vascular pharmacology*, 10: 626-630, 2012.
144. Deschaintre, Y, Richard, F, Leys, D, Pasquier, F: Treatment of vascular risk factors is associated with slower decline in Alzheimer disease. *Neurology*, 73: 674-680, 2009.
145. Helzner, EP, Luchsinger, JA, Scarmeas, N, Cosentino, S, Brickman, AM, Glymour, MM, Stern, Y: Contribution of vascular risk factors to the progression in Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 66: 343-348, 2009.
146. Iadecola, C: Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience*, 5: 347-360, 2004.
147. Gowert, NS, Donner, L, Chatterjee, M, Eisele, YS, Towhid, ST, Munzer, P, Walker, B, Ogorek, I, Borst, O, Grandoch, M, Schaller, M, Fischer, JW, Gawaz, M,

- Weggen, S, Lang, F, Jucker, M, Elvers, M: Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. *PloS one*, 9: e90523, 2014.
148. Gardella, JE, Ghiso, J, Gorgone, GA, Marratta, D, Kaplan, AP, Frangione, B, Gorevic, PD: Intact Alzheimer amyloid precursor protein (APP) is present in platelet membranes and is encoded by platelet mRNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 173: 1292-1298, 1990.
149. Chen, M, Inestrosa, NC, Ross, GS, Fernandez, HL: Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood. *Biochemical and biophysical research communications*, 213: 96-103, 1995.
150. Smirnov, A, Trupp, A, Henkel, AW, Bloch, E, Reulbach, U, Lewczuk, P, Riggert, J, Kornhuber, J, Wiltfang, J: Differential processing and secretion of A β peptides and sAPP α in human platelets is regulated by thrombin and prostaglandine 2. *Neurobiol Aging*, 30: 1552-1562, 2009.
151. Canobbio, I, Catricalà, S, Balduini, C, Torti, M: Calmodulin regulates the non-amyloidogenic metabolism of amyloid precursor protein in platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813: 500-506, 2011.
152. Bush, AI, Martins, RN, Rumble, B, Moir, R, Fuller, S, Milward, E, Currie, J, Ames, D, Weidemann, A, Fischer, P, et al.: The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets. *J Biol Chem*, 265: 15977-15983, 1990.
153. Borroni, B, Colciaghi, F, Pastorino, L, Pettenati, C, Cottini, E, Rozzini, L, Monastero, R, Lenzi, GL, Cattabeni, F, Di Luca, M, Padovani, A: Amyloid precursor protein in platelets of patients with Alzheimer disease: effect of acetylcholinesterase inhibitor treatment. *Archives of neurology*, 58: 442-446, 2001.
154. Catricala, S, Torti, M, Ricevuti, G: Alzheimer disease and platelets: how's that relevant. *Immunity & ageing : I & A*, 9: 20, 2012.
155. Casoli, T, Di Stefano, G, Giorgetti, B, Baliotti, M, Recchioni, R, Moroni, F, Marcheselli, F, Bernardini, G, Fattoretti, P, Bertoni-Freddari, C: Platelet as a physiological model to investigate apoptotic mechanisms in Alzheimer beta-amyloid peptide production. *Mech Ageing Dev*, 129: 154-162, 2008.
156. Casoli, T, Baliotti, M, Giorgetti, B, Solazzi, M, Scarpino, O, Fattoretti, P: Platelets in Alzheimer's disease-associated cellular senescence and inflammation. *Current pharmaceutical design*, 19: 1727-1738, 2013.
157. Mattson, MP: Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mistreatment, free radicals, and metabolic compromise. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 747: 50-76, 1994.
158. Kitaguchi, N, Takahashi, Y, Tokushima, Y, Shiojiri, S, Ito, H: Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature*, 331: 530-532, 1988.
159. Inyushin, MY, Sanabria, P, Rojas, L, Kucheryavykh, Y, Kucheryavykh, L: A β Peptide Originated from Platelets Promises New Strategy in Anti-Alzheimer's Drug Development. *BioMed research international*, 2017: 3948360, 2017.

160. Sutcliffe, JG, Hedlund, PB, Thomas, EA, Bloom, FE, Hilbush, BS: Peripheral reduction of beta-amyloid is sufficient to reduce brain beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 89: 808-814, 2011.
161. McFadyen, J, Peter, K: Forget about thrombosis: Platelets and Alzheimer's disease, yet another sticky situation. *Science signaling*, 9: fs9, 2016.
162. Tang, K, Hynan, LS, Baskin, F, Rosenberg, RN: Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease. *Journal of the neurological sciences*, 240: 53-58, 2006.
163. Colciaghi, F, Marcello, E, Borroni, B, Zimmermann, M, Caltagirone, C, Cattabeni, F, Padovani, A, Di Luca, M: Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology*, 62: 498-501, 2004.
164. Neumann, K, Farias, G, Slachevsky, A, Perez, P, Maccioni, RB: Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 25: 103-109, 2011.
165. Akingbade, OES, Gibson, C, Kalaria, RN, Mukaetova-Ladinska, EB: Platelets: Peripheral Biomarkers of Dementia? *J Alzheimers Dis*, 63: 1235-1259, 2018.
166. Thornton, S, Schedel, A, Besenfelder, S, Kluter, H, Bugert, P: Cholinergic drugs inhibit in vitro megakaryopoiesis via the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor. *Platelets*, 22: 390-395, 2011.
167. King, JR, Nordman, JC, Bridges, SP, Lin, MK, Kabbani, N: Identification and Characterization of a G Protein-binding Cluster in alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Biol Chem*, 290: 20060-20070, 2015.
168. Kooijman, S, Meurs, I, van der Stoep, M, Habets, KL, Lammers, B, Berbee, JF, Havekes, LM, van Eck, M, Romijn, JA, Korporaal, SJ, Rensen, PC: Hematopoietic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor deficiency increases inflammation and platelet activation status, but does not aggravate atherosclerosis. *J Thromb Haemost*, 13: 126-135, 2015.
169. Zubenko, GS, Malinakova, I, Chojnacki, B: Proliferation of internal membranes in platelets from patients with Alzheimer's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 46: 407-418, 1987.
170. Sevush, S, Jy, W, Horstman, LL, Mao, WW, Kolodny, L, Ahn, YS: Platelet activation in Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 55: 530-536, 1998.
171. Piletz, JE, Sarasua, M, Whitehouse, P, Chotani, M: Intracellular membranes are more fluid in platelets of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*, 12: 401-406, 1991.
172. Adunsky, A, Hershkowitz, M, Rabinowitz, M: Alzheimer's dementia and binding to alpha 2 adrenoreceptors in platelets. *Journal of the American Geriatrics Society*, 37: 741-744, 1989.

173. Parker, WD, Jr., Mahr, NJ, Filley, CM, Parks, JK, Hughes, D, Young, DA, Cullum, CM: Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease. *Neurology*, 44: 1086-1090, 1994.
174. Matsushima, H, Shimohama, S, Tanaka, S, Taniguchi, T, Hagiwara, M, Hidaka, H, Kimura, J: Platelet Protein Kinase C levels in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 15: 671-674, 1994.
175. Matsushima, H, Shimohama, S, Fujimoto, S, Takenawa, T, Kimura, J: Reduction of platelet phospholipase C activity in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders*, 9: 213-217, 1995.
176. Rosenberg, RN, Baskin, F, Fosmire, JA, Risser, R, Adams, P, Svetlik, D, Honig, LS, Cullum, CM, Weiner, MF: Altered amyloid protein processing in platelets of patients with Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 54: 139-144, 1997.
177. Koren, P, Diver-Haber, A, Adunsky, A, Rabinowitz, M, Hershkowitz, M: Uptake of serotonin into platelets of senile dementia of the Alzheimer type patients. *Journal of gerontology*, 48: B93-96, 1993.
178. Kumar, AM, Sevush, S, Kumar, M, Ruiz, J, Eisdorfer, C: Peripheral serotonin in Alzheimer's disease. *Neuropsychobiology*, 32: 9-12, 1995.
179. Smith, MJ, Braem, B, Davis, KD: Human platelet acetylcholinesterase: the effects of anticholinesterases on platelet function. *Thrombosis and haemostasis*, 42: 1615-1619, 1980.
180. Bennett, JA, Ture, SK, Schmidt, RA, Mastrangelo, MA, Cameron, SJ, Terry, LE, Yule, DI, Morrell, CN, Lowenstein, CJ: Acetylcholine inhibits platelet activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2019.
181. Talib, LL, Hototian, SR, Joaquim, HP, Forlenza, OV, Gattaz, WF: Increased iPLA2 activity and levels of phosphorylated GSK3B in platelets are associated with donepezil treatment in Alzheimer's disease patients. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 265: 701-706, 2015.
182. Mukaetova-Ladinska, EB, Abdell-All, Z, Andrade, J, da Silva, JA, Boksha, I, Burbaeva, G, Kalaria, RN, J, TOB: Platelet Tau Protein as a Potential Peripheral Biomarker in Alzheimer's Disease: An Explorative Study. *Current Alzheimer research*, 15: 800-808, 2018.
183. Schindler, SE, Bollinger, JG, Ovod, V, Mawuenyega, KG, Li, Y, Gordon, BA, Holtzman, DM, Morris, JC, Benzinger, TLS, Xiong, C, Fagan, AM, Bateman, RJ: High-precision plasma beta-amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis. *Neurology*, 2019.
184. Hampel, H, O'Bryant, SE, Castrillo, JI, Ritchie, C, Rojkova, K, Broich, K, Benda, N, Nistico, R, Frank, RA, Dubois, B, Escott-Price, V, Lista, S: PRECISION MEDICINE - The Golden Gate for Detection, Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease. *The journal of prevention of Alzheimer's disease*, 3: 243-259, 2016.

185. McNaull, BB, Todd, S, McGuinness, B, Passmore, AP: Inflammation and anti-inflammatory strategies for Alzheimer's disease--a mini-review. *Gerontology*, 56: 3-14, 2010.
186. Heneka, MT, Carson, MJ, El Khoury, J, Landreth, GE, Brosseon, F, Feinstein, DL, Jacobs, AH, Wyss-Coray, T, Vitorica, J, Ransohoff, RM, Herrup, K, Frautschy, SA, Finsen, B, Brown, GC, Verkhratsky, A, Yamanaka, K, Koistinaho, J, Latz, E, Halle, A, Petzold, GC, Town, T, Morgan, D, Shinohara, ML, Perry, VH, Holmes, C, Bazan, NG, Brooks, DJ, Hunot, S, Joseph, B, Deigendesch, N, Garaschuk, O, Boddeke, E, Dinarello, CA, Breitner, JC, Cole, GM, Golenbock, DT, Kummer, MP: Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14: 388-405, 2015.
187. McGeer, PL, Rogers, J, McGeer, EG: Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years. *J Alzheimers Dis*, 54: 853-857, 2016.
188. Lyman, M, Lloyd, DG, Ji, X, Vizcaychipi, MP, Ma, D: Neuroinflammation: the role and consequences. *Neuroscience research*, 79: 1-12, 2014.
189. Goehler, LE, Gaykema, RP, Nguyen, KT, Lee, JE, Tilders, FJ, Maier, SF, Watkins, LR: Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19: 2799-2806, 1999.
190. Holmes, C: Review: systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Neuropathology and applied neurobiology*, 39: 51-68, 2013.
191. Shen, XN, Niu, LD, Wang, YJ, Cao, XP, Liu, Q, Tan, L, Zhang, C, Yu, JT: Inflammatory markers in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis and systematic review of 170 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2019.
192. Lim, SL, Rodriguez-Ortiz, CJ, Kitazawa, M: Infection, systemic inflammation, and Alzheimer's disease. *Microbes and infection*, 17: 549-556, 2015.
193. Zandi, PP, Anthony, JC, Hayden, KM, Mehta, K, Mayer, L, Breitner, JC: Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study. *Neurology*, 59: 880-886, 2002.
194. Reale, M, Di Nicola, M, Velluto, L, D'Angelo, C, Costantini, E, Lahiri, DK, Kamal, MA, Yu, QS, Greig, NH: Selective acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors reduce amyloid-beta ex vivo activation of peripheral chemo-cytokines from Alzheimer's disease subjects: exploring the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Current Alzheimer research*, 11: 608-622, 2014.
195. Gawaz, M, Langer, H, May, AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 115: 3378-3384, 2005.
196. Schedel, A, Rolf, N: Genome-wide platelet RNA profiling in clinical samples. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 496: 273-283, 2009.

197. Rolf, N, Knoefler, R, Suttorp, M, Kluter, H, Bugert, P: Optimized procedure for platelet RNA profiling from blood samples with limited platelet numbers. *Clinical chemistry*, 51: 1078-1080, 2005.
198. Cardinal, DC, Flower, RJ: The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *Journal of pharmacological methods*, 3: 135-158, 1980.
199. Calatzis, A, Spannagl, M, Loreth, R: Multiplate platelet function analysis—application and interpretation. V2 0/072007 Dynabyte Medical, Monachium, 2007.
200. Pluta, R, Ulamek-Kozioł, M, Januszewski, S, Czuczwar, SJ: Platelets, lymphocytes and erythrocytes from Alzheimer's disease patients: the quest for blood cell-based biomarkers. *Folia Neuropathol*, 56: 14-20, 2018.
201. Roche: *Produktkatalog Multiplate Analyser & Zubehör*. 2013. Online: https://www.roche.de/res/content/7814/multiplate_produk-t-katalog2013.pdf, Stand: 2013.
202. Ruggeri, ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*, 8: 1227-1234, 2002.
203. Desch, S, Siegemund, A, Scholz, U, Adam, N, Eitel, I, de Waha, S, Furnau, G, Lurz, P, Wetzel, S, Schuler, G, Thiele, H: Platelet inhibition and GP IIb/IIIa receptor occupancy by intracoronary versus intravenous bolus administration of abciximab in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 101: 117-124, 2012.
204. Sack, U, Tarnok, A, Rothe, G: *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie; 163 Tabellen*, Karger Medical and Scientific Publishers, 2006.
205. Shattil, SJ, Hoxie, JA, Cunningham, M, Brass, LF: Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb. IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem*, 260: 11107-11114, 1985.
206. Shapiro, HM: *Practical flow cytometry*, John Wiley & Sons, 2005.
207. Adan, A, Alizada, G, Kiraz, Y, Baran, Y, Nalbant, A: Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37: 163-176, 2017.
208. R&D-Systems: *ELISA Guide*. 2019. Online: <https://resources.rndsystems.com/images/site/erg20106836.pdf>, Stand: 2019.
209. Castillo, L, MacCallum, DM: Cytokine measurement using cytometric bead arrays. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 845: 425-434, 2012.
- 210.bdbiosciences: *BD CBA Multiplexed Bead-Based Immunoassays*. 2019. Online: <http://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/bead-based-immunoassays/m/745474/formats>, Stand: 2019.
211. Roche: Multiplate® analyzer. Cut-off-values ADPtest and ASPItest. 2014.

212. Birks, J, Iakovidou, V, Tsolaki, M: Rivastigmine for Alzheimer's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*: Cd001191, 2000.
213. Rao, GH, Peller, JD, Knopman, DS, White, JG: Physiology and function of platelets from patients with Alzheimer's disease. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 40: 5-14, 1996.
214. Jones, CI: Platelet function and ageing. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 27: 358-366, 2016.
215. Mildner, A, Huang, H, Radke, J, Stenzel, W, Priller, J: P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*, 65: 375-387, 2017.
216. Thoonsen, H, Richard, E, Bentham, P, Gray, R, van Geloven, N, De Haan, RJ, Van Gool, WA, Nederkoorn, PJ: Aspirin in Alzheimer's disease: increased risk of intracerebral hemorrhage: cause for concern? *Stroke*, 41: 2690-2692, 2010.
217. Rabelo, AG, Teixeira, CV, Magalhaes, TN, Carletti-Cassani, AFM, Amato Filho, AC, Joaquim, HP, Talib, LL, Forlenza, O, Ribeiro, PA, Secolin, R, Lopes-Cendes, I, Cendes, F, Balthazar, ML: Is cerebral microbleed prevalence relevant as a biomarker in amnesic mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease? *The neuroradiology journal*, 30: 477-485, 2017.
218. Henry, A, Li, QX, Galatis, D, Hesse, L, Multhaup, G, Beyreuther, K, Masters, CL, Cappai, R: Inhibition of platelet activation by the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *British journal of haematology*, 103: 402-415, 1998.
219. Di Luca, M, Pastorino, L, Bianchetti, A, Perez, J, Vignolo, LA, Lenzi, GL, Trabucchi, M, Cattabeni, F, Padovani, A: Differential level of platelet amyloid beta precursor protein isoforms: an early marker for Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 55: 1195-1200, 1998.
220. Marksteiner, J, Humpel, C: Platelet-derived secreted amyloid-precursor protein-beta as a marker for diagnosing Alzheimer's disease. *Current neurovascular research*, 10: 297-303, 2013.
221. Schaeffer, EL, Gattaz, WF: Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A₂ enzyme. *Psychopharmacology*, 198: 1-27, 2008.
222. Gentile, MT, Reccia, MG, Sorrentino, PP, Vitale, E, Sorrentino, G, Puca, AA, Colucci-D'Amato, L: Role of cytosolic calcium-dependent phospholipase A₂ in Alzheimer's disease pathogenesis. *Molecular neurobiology*, 45: 596-604, 2012.
223. Forlenza, OV, Schaeffer, EL, Gattaz, WF: The role of phospholipase A₂ in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 114: 231-238, 2007.
224. Yang, X, Sheng, W, He, Y, Cui, J, Haidekker, MA, Sun, GY, Lee, JC: Secretory phospholipase A₂ type III enhances alpha-secretase-dependent amyloid precursor

- protein processing through alterations in membrane fluidity. *Journal of lipid research*, 51: 957-966, 2010.
225. Lee, JC, Simonyi, A, Sun, AY, Sun, GY: Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 116: 813-819, 2011.
226. Oberacher, H, Arnhard, K, Linhart, C, Diwo, A, Marksteiner, J, Humpel, C: Targeted Metabolomic Analysis of Soluble Lysates from Platelets of Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Compared to Healthy Controls: Is PC aeC40:4 a Promising Diagnostic Tool? *J Alzheimers Dis*, 57: 493-504, 2017.
227. Zubenko, GS, Cohen, BM, Reynolds, CF, 3rd, Boller, F, Malinakova, I, Keefe, N: Platelet membrane fluidity in Alzheimer's disease and major depression. *The American journal of psychiatry*, 144: 860-868, 1987.
228. Kozubski, W, Swiderek, M, Kloszewska, I, Gwozdziński, K, Watala, C: Blood platelet membrane fluidity and the exposition of membrane protein receptors in Alzheimer disease (AD) patients--preliminary Study. *Alzheimer disease and associated disorders*, 16: 52-54, 2002.
229. van Rensburg, SJ, Carstens, ME, Potocnik, FC, Aucamp, AK, Taljaard, JJ, Koch, KR: Membrane fluidity of platelets and erythrocytes in patients with Alzheimer's disease and the effect of small amounts of aluminium on platelet and erythrocyte membranes. *Neurochemical research*, 17: 825-829, 1992.
230. Zhu, D, Bungart, BL, Yang, X, Zhumadilov, Z, Lee, JC, Askarova, S: Role of membrane biophysics in Alzheimer's-related cell pathways. *Frontiers in neuroscience*, 9: 186, 2015.
231. Peters, I, Igbavboa, U, Schutt, T, Haidari, S, Hartig, U, Rosello, X, Bottner, S, Copanaki, E, Deller, T, Kogel, D, Wood, WG, Muller, WE, Eckert, GP: The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochimica et biophysica acta*, 1788: 964-972, 2009.
232. Zhao, J, Deng, Y, Jiang, Z, Qing, H: G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Alzheimer's Disease: A Focus on BACE1 Related GPCRs. *Frontiers in aging neuroscience*, 8: 58, 2016.
233. Yasumoto, T, Takamura, Y, Tsuji, M, Watanabe-Nakayama, T, Imamura, K, Inoue, H, Nakamura, S, Inoue, T, Kimura, A, Yano, S, Nishijo, H, Kiuchi, Y, Teplow, DB, Ono, K: High molecular weight amyloid beta1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*: fj201900604R, 2019.
234. Khalifat, N, Puff, N, Dliaa, M, Angelova, MI: Amyloid-beta and the failure to form mitochondrial cristae: a biomimetic study involving artificial membranes. *J Alzheimers Dis*, 28: 33-48, 2012.
235. Hooijmans, CR, Rutters, F, Dederen, PJ, Gambarota, G, Veltien, A, van Groen, T, Broersen, LM, Lutjohann, D, Heerschap, A, Tanila, H, Kiliaan, AJ: Changes in cerebral blood volume and amyloid pathology in aged Alzheimer APP/PS1 mice on

- a docosahexaenoic acid (DHA) diet or cholesterol enriched Typical Western Diet (TWD). *Neurobiology of disease*, 28: 16-29, 2007.
236. Bredesen, D, Sharlin, K, Jenkins, D, Okuno, M, Youngberg, W: Reversal of cognitive decline: 100 patients. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 8: 2161-0460.1000450, 2018.
237. Berlin, E, Shapiro, SG, Friedland, M: Platelet membrane fluidity and aggregation of rabbit platelets. *Atherosclerosis*, 51: 223-239, 1984.
238. Zhao, J, Wang, Q, Liang, G, Zheng, J: Molecular dynamics simulations of low-ordered alzheimer beta-amyloid oligomers from dimer to hexamer on self-assembled monolayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27: 14876-14887, 2011.
239. Williamson, R, Usardi, A, Hanger, DP, Anderton, BH: Membrane-bound beta-amyloid oligomers are recruited into lipid rafts by a fyn-dependent mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22: 1552-1559, 2008.
240. Choucair, A, Chakrapani, M, Chakravarthy, B, Katsaras, J, Johnston, LJ: Preferential accumulation of A β (1-42) on gel phase domains of lipid bilayers: an AFM and fluorescence study. *Biochimica et biophysica acta*, 1768: 146-154, 2007.
241. Kim, SI, Yi, JS, Ko, YG: Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts. *Journal of cellular biochemistry*, 99: 878-889, 2006.
242. Yang, X, Sun, GY, Eckert, GP, Lee, JC: Cellular membrane fluidity in amyloid precursor protein processing. *Molecular neurobiology*, 50: 119-129, 2014.
243. Canobbio, I, Guidetti, GF, Oliviero, B, Manganaro, D, Vara, D, Torti, M, Pula, G: Amyloid beta-peptide-dependent activation of human platelets: essential role for Ca²⁺ and ADP in aggregation and thrombus formation. *The Biochemical journal*, 462: 513-523, 2014.
244. Herczenik, E, Bouma, B, Korporaal, SJ, Strangi, R, Zeng, Q, Gros, P, Van Eck, M, Van Berkel, TJ, Gebbink, MF, Akkerman, JW: Activation of human platelets by misfolded proteins. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27: 1657-1665, 2007.
245. Seyfert, UT, Haubelt, H, Vogt, A, Hellstern, P: Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets*, 18: 199-206, 2007.
246. Femia, EA, Scavone, M, Lecchi, A, Cattaneo, M: Effect of platelet count on platelet aggregation measured with impedance aggregometry (Multiplate analyzer) and with light transmission aggregometry. *J Thromb Haemost*, 11: 2193-2196, 2013.
247. Stellos, K, Panagiota, V, Kogel, A, Leyhe, T, Gawaz, M, Laske, C: Predictive value of platelet activation for the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease patients. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30: 1817-1820, 2010.

248. Donner, L, Falker, K, Gremer, L, Klinker, S, Pagani, G, Ljungberg, LU, Lothmann, K, Rizzi, F, Schaller, M, Gohlke, H, Willbold, D, Grenegard, M, Elvers, M: Platelets contribute to amyloid-beta aggregation in cerebral vessels through integrin α IIb β 3-induced outside-in signaling and clusterin release. *Science signaling*, 9: ra52, 2016.
249. McLarnon, JG, Ryu, JK: Relevance of $\text{A}\beta$ 1-42 intrahippocampal injection as an animal model of inflamed Alzheimer's disease brain. *Current Alzheimer research*, 5: 475-480, 2008.
250. Petersen, MA, Ryu, JK, Akassoglou, K: Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nature reviews Neuroscience*, 19: 283-301, 2018.
251. Nurden, AT, Fiore, M, Nurden, P, Pillois, X: Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*, 118: 5996-6005, 2011.
252. Stellos, K, Katsiki, N, Tatsidou, P, Bigalke, B, Laske, C: Association of platelet activation with vascular cognitive impairment: implications in dementia development? *Current vascular pharmacology*, 12: 152-154, 2014.
253. Jaremo, P, Milovanovic, M, Buller, C, Nilsson, S, Winblad, B: P-selectin paradox and dementia of the Alzheimer type: circulating P-selectin is increased but platelet-bound P-selectin after agonist provocation is compromised. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 73: 170-174, 2013.
254. Jaremo, P, Milovanovic, M, Buller, C, Nilsson, S, Winblad, B: Low-density platelet populations demonstrate low in vivo activity in sporadic Alzheimer disease. *Platelets*, 23: 116-120, 2012.
255. Kessler, A, Shinitzky, M, Kessler, B: Number of platelet dense granules varies with age, schizophrenia and dementia. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 6: 330-333, 1995.
256. Mirinics, ZK, Calafat, J, Udby, L, Lovelock, J, Kjeldsen, L, Rothermund, K, Sisodia, SS, Borregaard, N, Corey, SJ: Identification of the presenilins in hematopoietic cells with localization of presenilin 1 to neutrophil and platelet granules. *Blood cells, molecules & diseases*, 28: 28-38, 2002.
257. Wolfe, MS, Xia, W, Ostaszewski, BL, Diehl, TS, Kimberly, WT, Selkoe, DJ: Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398: 513-517, 1999.
258. Ozsavci, D, Yardimci, T, Demirel, GY, Demiralp, E, Uras, F, Onder, E: Flow cytometric assay of platelet glycoprotein receptor numbers in hypercholesterolemia. *Platelets*, 13: 223-229, 2002.
259. Rakonczay, Z, Horvath, Z, Juhasz, A, Kalman, J: Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chemico-biological interactions*, 157-158: 233-238, 2005.

260. Guillozet, AL, Smiley, JF, Mash, DC, Mesulam, MM: Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of neurology*, 42: 909-918, 1997.
261. Mesulam, MM, Geula, C: Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Annals of neurology*, 36: 722-727, 1994.
262. Josviak, ND, Batistela, MS, Souza, RKM, Wegner, NR, Bono, GF, Sulzbach, CD, Simao-Silva, DP, Piovezan, MR, Souza, RLR, Furtado-Alle, L: Plasma butyrylcholinesterase activity: a possible biomarker for differential diagnosis between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies? *The International journal of neuroscience*, 127: 1082-1086, 2017.
263. Reale, M, Iarlori, C, Gambi, F, Lucci, I, Salvatore, M, Gambi, D: Acetylcholinesterase inhibitors effects on oncostatin-M, interleukin-1 beta and interleukin-6 release from lymphocytes of Alzheimer's disease patients. *Experimental gerontology*, 40: 165-171, 2005.
264. Donovan, LE, Dammer, EB, Duong, DM, Hanfelt, JJ, Levey, AI, Seyfried, NT, Lah, JJ: Exploring the potential of the platelet membrane proteome as a source of peripheral biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 5: 32, 2013.
265. Chen, SH, Bu, XL, Jin, WS, Shen, LL, Wang, J, Zhuang, ZQ, Zhang, T, Zeng, F, Yao, XQ, Zhou, HD, Wang, YJ: Altered peripheral profile of blood cells in Alzheimer disease: A hospital-based case-control study. *Medicine*, 96: e6843, 2017.
266. Inestrosa, NC, Alarcon, R, Arriagada, J, Donoso, A, Alvarez, J: Platelet of Alzheimer patients: increased counts and subnormal uptake and accumulation of [14C]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience letters*, 163: 8-10, 1993.
267. Sun, HL, Li, WW, Zhu, C, Jin, WS, Liu, YH, Zeng, F, Wang, YJ, Bu, XL: The Correlations of Plasma and Cerebrospinal Fluid Amyloid-Beta Levels with Platelet Count in Patients with Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*, 2018: 7302045, 2018.
268. Liang, Q-C, Jin, D, Li, Y, Wang, R-T: Mean platelet volume and platelet distribution width in vascular dementia and Alzheimer's disease. *Platelets*, 25: 433-438, 2014.
269. Wang, R-t, Jin, D, Li, Y, Liang, Q-c: Decreased mean platelet volume and platelet distribution width are associated with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*, 47: 644-649, 2013.
270. Chang, CY, Liang, HJ, Chow, SY, Chen, SM, Liu, DZ: Hemorheological mechanisms in Alzheimer's disease. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*, 14: 627-634, 2007.
271. Gamaldo, AA, Ferrucci, L, Rifkind, J, Longo, DL, Zonderman, AB: Relationship between mean corpuscular volume and cognitive performance in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 61: 84-89, 2013.
272. Zhang, P, Tang, H, Chen, K, Chen, Y, Xu, D: Biological variations of hematologic parameters determined by UniCel DxH 800 hematology analyzer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 137: 1106-1110, 2013.

273. Milovanovic, M, Nilsson, S, Winblad, B, Jelic, V, Behbahani, H, Shahnaz, T, Oweling, M, Jaremo, P: Inverse relationship between erythrocyte size and platelet reactivity in elderly. *Platelets*, 28: 182-186, 2017.
274. Reimers, RC, Sutera, SP, Joist, JH: Potentiation by red blood cells of shear-induced platelet aggregation: relative importance of chemical and physical mechanisms. *Blood*, 64: 1200-1206, 1984.
275. Lauriola, M, Mangiacotti, A, D'Onofrio, G, Cascavilla, L, Paris, F, Paroni, G, Seripa, D, Greco, A, Sancarlo, D: Neurocognitive Disorders and Dehydration in Older Patients: Clinical Experience Supports the Hydromolecular Hypothesis of Dementia. *Nutrients*, 10, 2018.
276. Prierer, BA, Robbins, J: Eating changes in mild-stage Alzheimer's disease: a pilot study. *Dysphagia*, 12: 212-221, 1997.
277. Boccardi, V, Ruggiero, C, Patrìti, A, Marano, L: Diagnostic Assessment and Management of Dysphagia in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 50: 947-955, 2016.
278. Glogowska, E, Gallagher, PG: Disorders of erythrocyte volume homeostasis. *International journal of laboratory hematology*, 37 Suppl 1: 85-91, 2015.
279. Winchester, LM, Powell, J, Lovestone, S, Nevado-Holgado, AJ: Red blood cell indices and anaemia as causative factors for cognitive function deficits and for Alzheimer's disease. *Genome medicine*, 10: 51, 2018.
280. Lunnon, K, Ibrahim, Z, Proitsi, P, Lourdasamy, A, Newhouse, S, Sattlecker, M, Furney, S, Saleem, M, Soinenen, H, Kłoszewska, I, Mecocci, P, Tsolaki, M, Vellas, B, Coppola, G, Geschwind, D, Simmons, A, Lovestone, S, Dobson, R, Hodges, A, Consortium, A: Mitochondrial dysfunction and immune activation are detectable in early Alzheimer's disease blood. *J Alzheimers Dis*, 30: 685-710, 2012.
281. Shad, KF, Aghazadeh, Y, Ahmad, S, Kress, B: Peripheral markers of Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells. *Synapse*, 67: 541-543, 2013.
282. Richardson, C, Gard, PR, Klugman, A, Isaac, M, Tabet, N: Blood pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease in relation to the use of acetylcholinesterase inhibitors. *Int J Geriatr Psychiatry*, 28: 1312-1317, 2013.
283. De Simoni, MG, Sironi, M, De Luigi, A, Manfredi, A, Mantovani, A, Ghezzi, P: Intracerebroventricular injection of interleukin 1 induces high circulating levels of interleukin 6. *The Journal of experimental medicine*, 171: 1773-1778, 1990.
284. Romero, LI, Kakucska, I, Lechan, RM, Reichlin, S: Interleukin-6 (IL-6) is secreted from the brain after intracerebroventricular injection of IL-1 beta in rats. *The American journal of physiology*, 270: R518-524, 1996.
285. Banks, WA: Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Current pharmaceutical design*, 11: 973-984, 2005.

286. de Vries, HE, Kuiper, J, de Boer, AG, Van Berkel, TJ, Breimer, DD: The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacological reviews*, 49: 143-155, 1997.
287. Shytle, RD, Mori, T, Townsend, K, Vendrame, M, Sun, N, Zeng, J, Ehrhart, J, Silver, AA, Sanberg, PR, Tan, J: Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *Journal of neurochemistry*, 89: 337-343, 2004.
288. Egea, J, Buendia, I, Parada, E, Navarro, E, Leon, R, Lopez, MG: Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochemical pharmacology*, 97: 463-472, 2015.
289. Alzarea, S, Rahman, S: Alpha-7 nicotinic receptor allosteric modulator PNU120596 prevents lipopolysaccharide-induced anxiety, cognitive deficit and depression-like behaviors in mice. *Behavioural brain research*, 366: 19-28, 2019.
290. Nicolas, CS, Amici, M, Bortolotto, ZA, Doherty, A, Csaba, Z, Fafouri, A, Dournaud, P, Gressens, P, Collingridge, GL, Peineau, S: The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *Jak-stat*, 2: e22925, 2013.
291. Akaike, A, Takada-Takatori, Y, Kume, T, Izumi, Y: Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 40: 211-216, 2010.
292. Arias, E, Gallego-Sandin, S, Villarroya, M, Garcia, AG, Lopez, MG: Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 315: 1346-1353, 2005.
293. Borovikova, LV, Ivanova, S, Zhang, M, Yang, H, Botchkina, GI, Watkins, LR, Wang, H, Abumrad, N, Eaton, JW, Tracey, KJ: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405: 458-462, 2000.
294. Wang, H, Yu, M, Ochani, M, Amella, CA, Tanovic, M, Susarla, S, Li, JH, Wang, H, Yang, H, Ulloa, L, Al-Abed, Y, Czura, CJ, Tracey, KJ: Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421: 384-388, 2003.
295. Suzuki, T, Hide, I, Matsubara, A, Hama, C, Harada, K, Miyano, K, Andra, M, Matsubayashi, H, Sakai, N, Kohsaka, S, Inoue, K, Nakata, Y: Microglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors drive a phospholipase C/IP3 pathway and modulate the cell activation toward a neuroprotective role. *Journal of neuroscience research*, 83: 1461-1470, 2006.
296. Akiyama, H, Barger, S, Barnum, S, Bradt, B, Bauer, J, Cole, GM, Cooper, NR, Eikelenboom, P, Emmerling, M, Fiebich, BL, Finch, CE, Frautschy, S, Griffin, WS, Hampel, H, Hull, M, Landreth, G, Lue, L, Mrak, R, Mackenzie, IR, McGeer, PL, O'Banion, MK, Pachter, J, Pasinetti, G, Plata-Salaman, C, Rogers, J, Rydel, R, Shen, Y, Streit, W, Strohmeyer, R, Tooyoma, I, Van Muiswinkel, FL, Veerhuis, R, Walker, D, Webster, S, Wegrzyniak, B, Wenk, G, Wyss-Coray, T: Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21: 383-421, 2000.

297. Darweesh, SKL, Wolters, FJ, Ikram, MA, de Wolf, F, Bos, D, Hofman, A: Inflammatory markers and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 14: 1450-1459, 2018.
298. Heppner, FL, Ransohoff, RM, Becher, B: Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature reviews Neuroscience*, 16: 358-372, 2015.
299. Saleem, M, Herrmann, N, Swardfager, W, Eisen, R, Lanctot, KL: Inflammatory Markers in Mild Cognitive Impairment: A Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*, 47: 669-679, 2015.
300. Bermejo, P, Martin-Aragon, S, Benedi, J, Susin, C, Felici, E, Gil, P, Ribera, JM, Villar, AM: Differences of peripheral inflammatory markers between mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Immunology letters*, 117: 198-202, 2008.
301. Hesse, R, Wahler, A, Gummert, P, Kirschmer, S, Otto, M, Tumani, H, Lewerenz, J, Schnack, C, von Arnim, CA: Decreased IL-8 levels in CSF and serum of AD patients and negative correlation of MMSE and IL-1beta. *BMC neurology*, 16: 185, 2016.
302. Shaftel, SS, Kyrkanides, S, Olschowka, JA, Miller, JN, Johnson, RE, O'Banion, MK: Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *The Journal of clinical investigation*, 117: 1595-1604, 2007.
303. Swardfager, W, Lanctot, K, Rothenburg, L, Wong, A, Cappell, J, Herrmann, N: A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biological psychiatry*, 68: 930-941, 2010.
304. Holmes, C, El-Okl, M, Williams, AL, Cunningham, C, Wilcockson, D, Perry, VH: Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74: 788-789, 2003.
305. Gambi, F, Reale, M, Iarlori, C, Salone, A, Toma, L, Paladini, C, De Luca, G, Feliciani, C, Salvatore, M, Salerno, RM, Theoharides, TC, Conti, P, Exton, M, Gambi, D: Alzheimer patients treated with an AchE inhibitor show higher IL-4 and lower IL-1 beta levels and expression in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of clinical psychopharmacology*, 24: 314-321, 2004.
306. Kokras, N, Stamouli, E, Sotiropoulos, I, Katirtzoglou, EA, Siarkos, KT, Dalagiorgou, G, Alexandraki, KI, Coulocheri, S, Piperi, C, Politis, AM: Acetyl Cholinesterase Inhibitors and Cell-Derived Peripheral Inflammatory Cytokines in Early Stages of Alzheimer's Disease. *Journal of clinical psychopharmacology*, 38: 138-143, 2018.
307. Uslu, S, Akarkarasu, ZE, Ozbabalik, D, Ozkan, S, Colak, O, Demirkan, ES, Ozkiris, A, Demirustu, C, Alatas, O: Levels of amyloid beta-42, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurochemical research*, 37: 1554-1559, 2012.

308. McCarthy, MM, Woolley, CS, Arnold, AP: Incorporating sex as a biological variable in neuroscience: what do we gain? *Nature reviews Neuroscience*, 18: 707-708, 2017.
309. Giacobini, E, Pepeu, G: Sex and Gender Differences in the Brain Cholinergic System and in the Response to Therapy of Alzheimer Disease with Cholinesterase Inhibitors. *Current Alzheimer research*, 15: 1077-1084, 2018.
310. Hall, BJ, Abreu-Villaca, Y, Cauley, M, Junaid, S, White, H, Kiany, A, Levin, ED: The ventral hippocampal muscarinic cholinergic system plays a key role in sexual dimorphisms of spatial working memory in rats. *Neuropharmacology*, 117: 106-113, 2017.
311. Payami, H, Zareparsy, S, Montee, KR, Sexton, GJ, Kaye, JA, Bird, TD, Yu, CE, Wijsman, EM, Heston, LL, Litt, M, Schellenberg, GD: Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for familial Alzheimer disease: a possible clue to the higher incidence of Alzheimer disease in women. *American journal of human genetics*, 58: 803-811, 1996.
312. Farlow, MR, Lahiri, DK, Poirier, J, Davignon, J, Schneider, L, Hui, SL: Treatment outcome of tacrine therapy depends on apolipoprotein genotype and gender of the subjects with Alzheimer's disease. *Neurology*, 50: 669-677, 1998.
313. Alves-Amaral, G, Pires-Oliveira, M, Andrade-Lopes, AL, Chiavegatti, T, Godinho, RO: Gender-related differences in circadian rhythm of rat plasma acetyl- and butyrylcholinesterase: effects of sex hormone withdrawal. *Chemico-biological interactions*, 186: 9-15, 2010.
314. Ferretti, MT, Iulita, MF, Cavedo, E, Chiesa, PA, Dimech, AS, Chadha, AS, Baracchi, F, Girouard, H, Misoch, S, Giacobini, E: Sex differences in Alzheimer disease—the gateway to precision medicine. *Nature Reviews Neurology*: 1, 2018.
315. Ferris, S, Lane, R, Sfikas, N, Winblad, B, Farlow, M, Feldman, HH: Effects of gender on response to treatment with rivastigmine in mild cognitive impairment: A post hoc statistical modeling approach. *Gender medicine*, 6: 345-355, 2009.
316. Scacchi, R, Gambina, G, Broggio, E, Corbo, RM: Sex and ESR1 genotype may influence the response to treatment with donepezil and rivastigmine in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*, 29: 610-615, 2014.
317. Haywood, WM, Mukaetova-Ladinska, EB: Sex influences on cholinesterase inhibitor treatment in elderly individuals with Alzheimer's disease. *The American journal of geriatric pharmacotherapy*, 4: 273-286, 2006.
318. Pike, CJ, Carroll, JC, Rosario, ER, Barron, AM: Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*, 30: 239-258, 2009.
319. Scharf, RE: Drugs that affect platelet function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 38: 865-883, 2012.
320. Torres, R, Tormey, CA, Stack, G: Fluid motion and shear forces in platelet storage bags with different modes of agitation. *Vox sanguinis*, 111: 209-212, 2016.

321. McEwen, BJ: The influence of diet and nutrients on platelet function. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 40: 214-226, 2014.
322. Zimmermann, M, Borroni, B, Cattabeni, F, Padovani, A, Di Luca, M: Cholinesterase inhibitors influence APP metabolism in Alzheimer disease patients. *Neurobiology of disease*, 19: 237-242, 2005.
323. Monacelli, F, Rosa, G: Cholinesterase inhibitors: cardioprotection in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 42: 1071-1077, 2014.
324. Farooq, MU, Min, J, Goshgarian, C, Gorelick, PB: Pharmacotherapy for Vascular Cognitive Impairment. *CNS drugs*, 31: 759-776, 2017.
325. Alagiakrishnan, K, McCracken, P, Feldman, H: Treating vascular risk factors and maintaining vascular health: is this the way towards successful cognitive ageing and preventing cognitive decline? *Postgraduate medical journal*, 82: 101-105, 2006.
326. Kandiah, N, Pai, M-C, Senanarong, V, Looi, I, Ampil, E, Park, KW, Karanam, AK, Christopher, S: Rivastigmine: The advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical interventions in aging*, 12: 697–707, 2017.
327. Kaushik, V, Smith, ST, Mikobi, E, Raji, MA: Acetylcholinesterase Inhibitors: Beneficial Effects on Comorbidities in Patients With Alzheimer's Disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*: 1533317517734352, 2017.
328. Wiest, I, Wiemers, T, Kraus, M-J, Neeb, H, Strasser, EF, Hausner, L, Frölich, L, Bugert, P: Multivariate Platelet Analysis Differentiates Between Patients with Alzheimer's Disease and Healthy Controls at First Clinical Diagnosis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 71: 993-1004, 2019.

7 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungen

<i>Abbildung 2 – Entwicklung der Aβ-Level im Plasma bei Fortschreiten der Alzheimer-Erkrankung (AD).</i>	11
<i>Abbildung 3 – Cholinerges System des basalen Vorderhirns.</i>	14
<i>Abbildung 4 – neuronale Veränderungen bei AD⁹⁹.</i>	16
<i>Abbildung 5 – Multiplate® Messprinzip.</i>	38
<i>Abbildung 6 – Graphische Ausgabe der Ergebnisse</i>	39
<i>Abbildung 7 – Agonisten und ihre Aktivierungswege</i>	40
<i>Abbildung 8 – Lichtstreuung in der Durchflusszytometrie.</i>	43
<i>Abbildung 9 – Prinzip des Sandwich-ELISA.</i>	45
<i>Abbildung 10 – Prinzip des Cytometric Bead Array</i>	46
<i>Abbildung 11 – Cut-off Werte beim ASPI-Test.</i>	47
<i>Abbildung 12 – Mögliche Gruppierungen der Datenmenge</i>	48
<i>Abbildung 13 – Kumulierte Dosis Rivastigmin.</i>	48
<i>Abbildung 14 – Therapietage aufgetragen auf Verlaufsnummer</i>	49
<i>Abbildung 15 – Therapiezeit aufgeteilt nach Pflasterdosis-Gruppe.</i>	50
<i>Abbildung 16 – Patienteneinschluss und Drop-outs</i>	52
<i>Abbildung 17 – Verlauf der AuC-Mittelwerte der unstimulierten Thrombozytenaggregation.</i>	55
<i>Abbildung 18 – Verlauf der AuC-Mittelwerte bei Arachidonsäure-stimulierter Thrombozytenaggregation</i>	56
<i>Abbildung 19 – Aggregation im Multiplate nach Stimulation der Thrombozyten mit Arachidonsäure.</i>	57
<i>Abbildung 20 – Verlauf der AuC-Mittelwerte bei ADP-stimulierter Thrombozytenaggregation.</i>	58
<i>Abbildung 21 – Aggregation im Multiplate nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP</i>	58
<i>Abbildung 22 – Unstimulierte Thrombozytenaggregation getrennt nach Geschlecht</i>	59
<i>Abbildung 23 – Mittelwerte der CD62P-Expression nach Stimulation mit ADP in der durchflusszytometrischen Untersuchung.</i>	61
<i>Abbildung 24 – Entwicklung der CD62P-Expression nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP</i>	62

<i>Abbildung 25 – U46619 induzierte Thrombozyten-Degranulation</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 26 – Mittelwerte der Thrombozytenzahl bei Kontrollen und Patienten.....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 27 – Hämoglobin im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 28 – MCH-Mittelwert im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 29 – MCHC-Mittelwert im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 30 – Verlauf des Mittelwerts der Lymphozytenzahl</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 31 – Verlauf des Hb-Mittelwerts unter AChE-I Therapie bei männlichen und weiblichen Patienten und Kontrollen.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 32 – Verlauf des MCHC-Mittelwerts unter AChE-I Therapie bei männlichen und weiblichen Patienten und Kontrollen.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 33 – IL-1β im Verlauf der Acetylcholinesterase-Inhibitor Therapie</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 34 – Boxplot der IL-1β Spiegel im Verlauf der AChE-I Therapie.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 35 – Schematische Darstellung der Thromboxansynthese im Thrombozyten</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 36 – Einfluss der Membranfluidität auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 37 – Anti-inflammatorischer Pathway über den nAChR α7</i>	<i>95</i>

Tabellen

Tabelle 1 – APP-spaltende Sekretasen mit Schnittstelle und Funktion	8
Tabelle 2 – Veränderungen in Thrombozyten bei Alzheimer-Erkrankung.....	25
Tabelle 3 – Übersicht über die wichtigsten Ergebnisse aus dem Review von Akingbade et al. ¹⁶⁵ zu thrombozytären Biomarkern in der Alzheimer-Diagnostik.....	27
Tabelle 4 – Kommerzielle Puffer, Medien und Substanzen	34
Tabelle 5 – Selbst hergestellte Puffer	35
Tabelle 6 – Pharmakologische Substanzen	35
Tabelle 7 – Gebrauchsfertige Kits.....	35
Tabelle 8 – Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	36
Tabelle 9 – Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 10 – Geräte mit Workstations und Software.....	36
Tabelle 11 – Pipettierschema FACS Analyse (alle Volumina in µl)	44
Tabelle 12 – Demographische Daten im Vergleich der Gruppen	53
Tabelle 13 – Ergebnisse Multiplate® Vergleich KO (n=29) vs. AD-U (n=40).....	54
Tabelle 14 – Thrombozytendegranulation im Verlauf der AChE-I Therapie bei Alzheimer-Patienten und gesunden Kontrollen mit und ohne Plättchenstimulation. .	60
Tabelle 15 – Thrombozytenkennzahlen im Verlauf der AChE-I Therapie bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.....	65
Tabelle 16 – Hämoglobinwert und Erythrozytenkennzahlen im Verlauf der AChE-I Therapie bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen	66
Tabelle 17 – Vergleich Entzündungsparameter AD-U vs. KO	72
Tabelle 18 – Medikamentenprofil der Studienteilnehmer (40 AD, 29 KO).	101

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Wiest, Isabella Catharina
Geburtsdatum: 29. Februar 1992
Geburtsort: Ludwigsburg
Familienstand: ledig
Vater: Albrecht Joachim Wiest, Dipl.-Kfm.
Mutter: Cornelia Gabriele Wiest

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 – 2008 Ellentalgymnasien Bietigheim-Bissingen
2008 - 2011 Wirtschaftsgymnasium,
Berufliches Schulzentrum Bietigheim-Bissingen
Juli 2011 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2011/12 Beginn des Studiums der Humanmedizin
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
03.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2014-2016 Studium Health Economics (M.Sc.)
Universität Heidelberg, Mannheim Institute of Public Health
04.10.2016 Abschluss Master of Science in Health Economics

12.10.2017	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
06.12.2018	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
23.01.2019	Approbation als Ärztin

PRAKTISCHES JAHR UND BERUFLICHER WERDEGANG

11/2017 – 01/2018	Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
02/2018 – 04/2018	II. Medizinische Klinik, Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie, Ernährungsmedizin, Universitätsklinikum Mannheim
05/2018 – 07/2018	Department of Otolaryngology, Harvard Medical School, Boston, USA
08/2018 – 11/2018	Groupe Chirurgicale Kirchberg, Hopitaux Robert Schuman, Luxemburg
09/2019 - heute	Assistenzärztin, II. Medizinische Klinik, Gastroenterologie, Hepatologie, Infektiologie, Ernährungsmedizin, Universitätsklinikum Mannheim

PUBLIKATIONEN

Wiest I, Wiemers T, Kraus MJ, Neeb H, Strasser EF, Hausner L, Frölich L, Bugert P. 2019. Multivariate Platelet Analysis Differentiates between Patients with Alzheimer's Disease and Healthy Controls at First Clinical Diagnosis. Journal of Alzheimers Disease. 2019;71(3):993-100

9 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Herrn Professor Dr. med. Harald Klüter, dem Direktor des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunologie, für die Möglichkeiten, meine Doktorarbeit im molekularbiologischen Labor seines Instituts durchzuführen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. rer. nat. Peter Bugert für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es durch exzellente Einbindung in die Arbeitsgruppe zu bearbeiten. Nur dank seiner Betreuung, konstruktiven Kritik aber auch dem nötigen Freiraum und Verständnis konnte dieses Projekt realisiert werden.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr med. Frölich und Frau Dr. med. Lucrezia Hausner aus dem Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim, für die Kooperation danken. Ohne die konstruktive Zusammenarbeit wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Frau Dr. Angelika Schedel danke ich für die Einarbeitung und Betreuung zu Beginn der Arbeitsphase, das mir entgegengebrachte Vertrauen und dafür, dass sie mich bei den ersten Schritten der Doktorarbeit mit ihrem Enthusiasmus für die Forschung angesteckt hat.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Sylvia Büttner vom Institut für Medizinische Statistik, Biomathematik und Informationsverarbeitung der Medizinischen Fakultät Mannheim für die Durchführung der komplexen statistischen Modelle und ihre Geduld und Hilfsbereitschaft bei Nachfragen und Überarbeitungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe Molekularbiologie mit Gabi Rink und Katharina Kemp, die mich im Labor unermüdlich und stets mit motivierender Freude unterstützt haben. Nicht nur der technische Rat, sondern auch die familiäre Atmosphäre haben mir eine ausgezeichnete, konstruktive Laborarbeit ermöglicht.

Für die wertvollen Hinweise, die zur Fertigstellung dieser Arbeit unerlässlich waren, danke ich ganz herzlich Herrn Dr. Franz-Simon Centner, der mich darüber hinaus

immer mit viel Geduld, wertvollen Anregungen, aber auch einem unerschütterlichen Glauben an mich und diese Arbeit überaus wertvoll unterstützt hat.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, Cornelia Wiest und Albrecht Wiest sowie meinem Bruder, Philipp Wiest, in aller Herzlichkeit danken, die meine Neugier auf das Leben stets gefördert und mich auf meinem Weg bedingungslos unterstützt haben. Nur dank ihrem wertvollen Rat und der mannigfaltigen Unterstützung konnte ich dieses Projekt verwirklichen.