

## Neuroscience Letters

Journal Homepage: [www.elsevier.com/locate/neulet](http://www.elsevier.com/locate/neulet)

### Vorbeugende Wirkungen von *Chlorella* auf den kognitiven Verfall bei altersbedingter Demenz von Mustermäusen.

Yuya Nakashima<sup>1</sup>, Ikuroh Ohsawa<sup>2,3</sup>, Fumiko Konishi<sup>1</sup>, Takashi Hasegawa<sup>1</sup>,  
Shoichiro Kumamoto<sup>1</sup>, Yoshihiko Suzuki<sup>2</sup>, Shigeo Ohta<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Research Laboratories, Chlorella Industry Co. Ltd., 1343 Hisatomi, Chikugo, Fukuoka 833-0056, Japan

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Development and Aging Sciences, Nippon Medical School, 1-396 Konsugi-cho,

Nakahara-ku, Kawasaki, Kanagawa 211-8533, Japan

<sup>3</sup> The Center of Molecular Hydrogen Medicine, Institute of Development and Aging Sciences, Nippon Medical School, Kawasaki, Kanagawa 211-8533, Japan

#### Artikel-Info

Artikelchronik

Eingelangt am 15 Juni 2009

Überarbeiteter Text eingelangt am 29 Juli 2009

Anerkannt am 18 August 2009

#### Schlüsselwörter:

Alterung

Aldehyde

ALDH2

Alzheimer Krankheit

Oxidative Stress

Parachlorella beyerinckii

#### Zusammenfassung

Oxidativer Stress ist eine der Hauptursachen für altersbedingten Gedächtnisverlust und kognitiven Verfall. Zellschädigende Aldehyde stammen von Lipidperoxiden ab, deren Anhäufung für die altersbedingte Neurodegeneration verantwortlich sein könnte, inklusive der Alzheimer Krankheit. Da die Aldehyd-Dehydrogenasen solche Aldehyde detoxifizieren, haben wir transgene Mäuse gezüchtet (DAL101Mäuse), mit mitochondrialem Aldehyd-Dehydrogenase 2- (ALDH2) Aktivitätsmangel, als Modell für altersbedingte Demenz. Dieses Mustertier entwickelt sich altersabhängig durch anhaltenden oxidativen Stress, und das ermöglicht es uns, Lebensmittel zu untersuchen, die der Demenz vorbeugen. Da *Chlorella* eine Algenart ist, die verschiedene anti-oxidative Wirkungen aufweist, untersuchten wir, ob *Chlorella* das Potenzial hat, altersbedingten kognitiven Beeinträchtigungen vorzubeugen. Wir fütterten DAL101 Mäuse mit *Chlorella*, und untersuchten deren Wirkungen auf oxidativen Stress und das Fortschreiten des kognitiven Verfalls unter Verwendung des Morris-Wasserlabyrinths und des Objekt-Erkennungs-Tests. Wie aus beiden Methoden hervorgeht, hatte *Chlorella* Kost die Tendenz, den oxidativen Stress zu reduzieren, und verhinderte signifikant den Rückgang der kognitiven Fähigkeit. Weiters erhöhte die Einnahme von *Chlorella* die Anzahl der aktiven Astrozyten im Gehirn von DAL101 Mäusen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die länger andauernde Einnahme von *Chlorella* das Potenzial hat, dem Fortschreiten der kognitiven Beeinträchtigung vorzubeugen.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. Alle Rechte vorbehalten.

\* Korrespondierender Autor. Tel.: +81 44 733 9267; Fax: +81 44 733 9268.

E-Mail Adresse: [ohta@nms.ac.jp](mailto:ohta@nms.ac.jp) (S. Ohta).

Der Verfall der kognitiven Fähigkeit bei der Alzheimer Krankheit (AK) ist mit dem Altern verbunden, und könnte durch andauernden oxidativen Stress im Gehirn entstehen [13]. Hochreaktive Aldehyde, wie das 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), werden spontan durch Lipidperoxide erzeugt [24]. 4-HNE reagiert besonders schnell mit den meisten Biomolekülen und verletzt lebende Zellen [29]. Im Gehirn von Alzheimer-(AK) und Parkinsonpatienten (MP) wurden tatsächlich erhöhte Spiegel von 4-HNE-modifizierten Proteinen beobachtet. [11,33]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Antioxidantien, die oxidativen Stress reduzieren können, eine wichtige Rolle in der Vorbeugung der kognitiven Beeinträchtigung und der Neurodegeneration spielen; allerdings haben die meisten klinischen Versuche, die ein einziges diätetisches Antioxidant anbieten, keine großen Erfolge bei der Vorbeugung von Demenz. [12, 19, 23].

Die dominant-negative Form von Aldehyd Dehydrogenase 2 (ALDH2) kommt in Mongoloiden vor. Japanische, koreanische und chinesische Gruppen haben unabhängig voneinander berichtet, dass der genetische Polymorphismus (ALDH2\*2) ein Risiko für Alzheimer Krankheit darstellt [4, 5, 30]. Zellen mit ALDH2\*2 Ausdruck sind anfällig für 4-HNE, und der Zelltod wird durch die Behandlung mit 4-HNE induziert [15, 18].

Um die Rolle solcher toxischer Aldehyde zu untersuchen, haben wir transgene Mäuse gezüchtet, mit der Expression einer dominant-negativen Form von ALDH2 (ALDH2\*2) im Gehirn (DAL101Mäusen) [16]. Die Mäuse hatten eine reduzierte Fähigkeit, das 4-HNE in ihren corticalen Neuronen zu detoxifizieren, und die Akkumulation von 4-HNE im Gehirn war beschleunigt. Infolgedessen verkürzte sich ihre Lebensspanne, und die altersbedingte Neurodegeneration und die Hyperphosphorylierung von Tau wurden beobachtet. Der Ausbruch des kognitiven Verfalls korrelierte mit der Neurodegeneration, die darüber hinaus durch das APOE Knockout beschleunigt wurde. Es wurden keine offensichtlichen pathologischen Merkmale, inklusive der kognitiven Funktion, in jungen DAL101 Mäusen beobachtet, woraus sich ergibt, dass im Laufe ihres Alterns keine physiologischen oder neurologischen Veränderungen eintreten. Nach der Heranreife häufte sich der oxidative Stress im Gehirn an, und kognitive Defizite entwickelten sich bei älteren DAL101 Mäusen [16, 17]. Die Bedeutung dieser Mustermäuse liegt im altersbedingten Ausbruch von neurodegenerativen Störungen. Somit werden diese Mustertiere hilfreich sein, um Lebensmittel zu erforschen, die altersbedingter Demenz vorbeugen können.

*Chlorella* ist eine Algenart. Sie, und ihr Extrakt mit heißem Wasser, wurden lange als Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Es wurde berichtet, dass *Chlorella* verschiedene immunopharmakologische Effekte aufweist [1, 6, 28], und in vitro und in vivo als Antioxidant wirkt [10, 22, 26], wahrscheinlich wegen ihres hohen Gehalts an Chlorophyll und Carotinoiden, inklusive  $\beta$ -Karatol und Lutein.

In dieser Studie fütterten wir Mustermäuse mit altersbedingter Demenz über einen längeren Zeitraum mit *Chlorella* und behaupten, dass *Chlorella* das Potenzial hat, altersbedingter Demenz vorzubeugen.

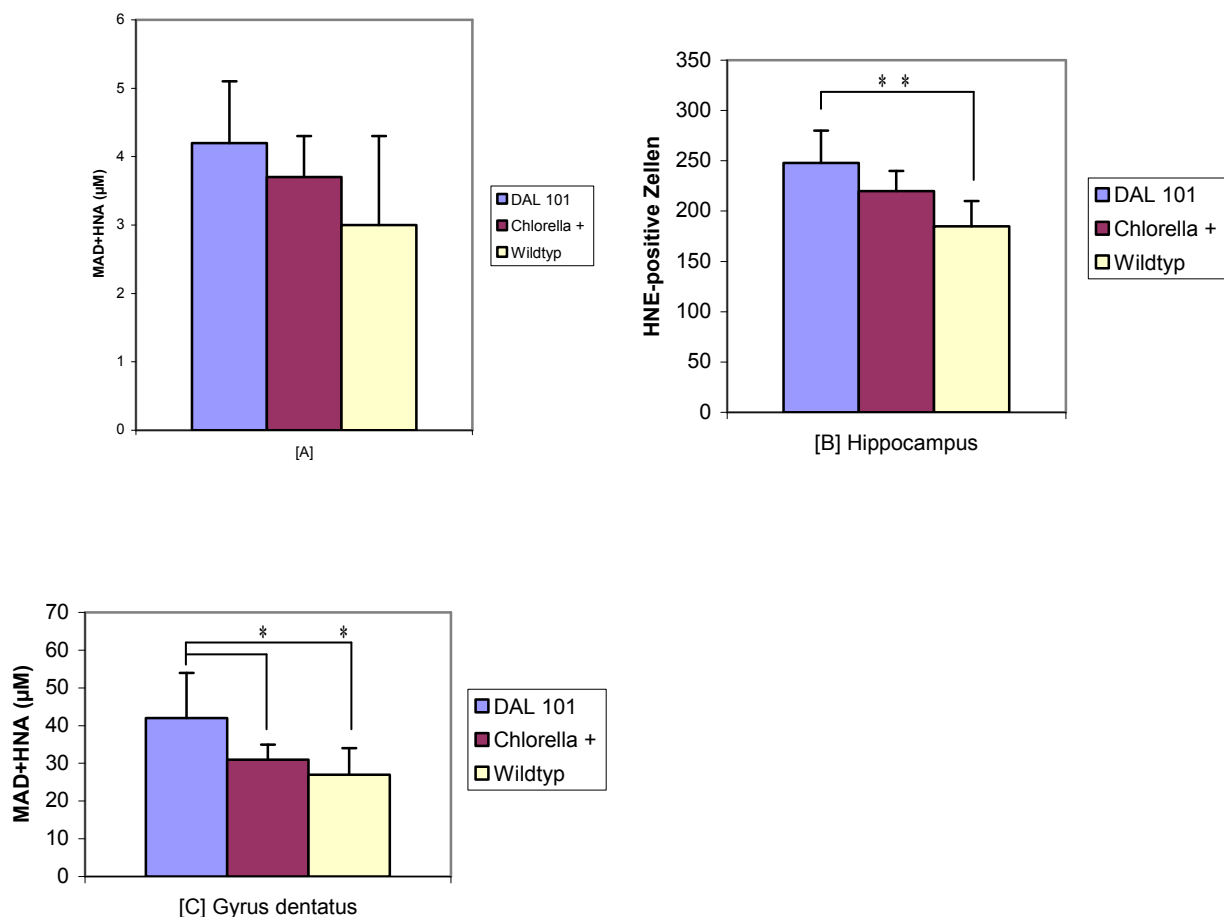
Wir haben transgene Mäuse gezüchtet, mit der Expression einer dominant-negativen Form von ALDH2 (ALDH2\*2) im Gehirn (DAL101 Mäusen), wie eingangs schon erwähnt [16]. Gefüttert wurden DAL101 Mäuse mit dem Basis-Futter CE-2 (Clea Japan, Tokyo) (Kontrollgruppe) oder mit einem mit 5% *Chlorella* angereicherten Futter (*Chlorella* Behandlungs-Gruppe) für 16 Monate, ab dem Alter von 8 Wochen.

Die Wildtyp-Mäuse C57BL/6 (Kyudo, Fukuoka, Japan) wurden ebenso als eine normale Gruppe mit dem Basisfutter CE-2 gefüttert. Den Tieren wurde freier Zugang zu Wasser und Futter gewährt. Das Körpergewicht wurde wöchentlich gemessen.

Die *Chlorella*, die für die Futterzubereitung verwendet wurde, war die *Parachlorella beyerinckii* CK-5 Sorte, kultiviert, getrocknet und pulverisiert durch *Chlorella Industry Co. Ltd.*. Die Tiere wurden nach den Experiments-Richtlinien für Tiere von *Chlorella Industry Co. Ltd.* gehalten, die in Übereinstimmung mit den 'Standards Concerning Maintenance and Storage of Experimental Animals' (Vermerk Nr. 6 des Büros des Premierministers vom 27. März, 1980, teilweise revidiert am 28. Mai 2002) eingeführt wurden.

Die Mäuse wurden auf das Morris-Wasserlabyrinth dressiert [14, 16]. Das Wasserlabyrinth war ein rundes Pool, gefüllt mit trübem Wasser bei Raumtemperatur (Durchmesser 1,1 m). Eine durchsichtige Plattform (Durchmesser 10 cm) wurde 1cm unter der Oberfläche versteckt. Wenn eine Maus die Plattform innerhalb von 60 Sek. nicht fand, wurde sie vorsichtig zur Plattform hingeführt, und durfte sich für 20 Sek. dort aufhalten. 5 Tage lang hatten die Mäuse vier Versuche pro Tag. Der Untersucher bestimmte die Schwimmzeit bis die Maus die Plattform erreichte (Latenzzeit). Die Erinnerung an das räumliche Training wurde 24 Stunden nach dem letzten Trainingsversuch bewertet. Ein einziger Probeversuch bestand aus 60 Sekunden freiem Schwimmen im Pool ohne die Plattform.

Der visuelle Objekt-Erkennungs-Test (vORT) wurde verwendet, um das Wiedererkennungsgedächtnis zu testen [16, 31]. Vor dem Training wurden die Mäuse erst für 24 Stunden in einem Käfig gehalten. Während einer 10-minütigen Trainingseinheit wurden den Mäusen zwei Plastikblöcke mit unterschiedlicher Form und Farbe vorgeführt. Die Objekterkennung wurde anhand der Anzahl der Annäherungen zum, und/oder des Schnüffeln am Objekt bewertet, und als Präferenzprozentanteil (Erkennungsindex) gezeigt. Einen Tag nach dem Training wurde einer der Blöcke, auf den die Mäuse konditioniert waren, durch ein neues Objekt ersetzt, um die Merkfähigkeit zu testen, und der Erkennungsindex wurde während einer 5-minütigen Testung bewertet.



**Fig.1** Auswirkungen der Einnahme von *Chlorella* auf oxidativen Stress. (A) Vollblut MDA+HNA wurde nach 6-monatiger Verabreichung von *Chlorella* gemessen. (B und C). HNE-positive Zellen wurden im ganzen Hippocampus (B) und in der Gyrus Dentatus Region gezählt (C). DAL101: Dal101 normale Kost (n=10). + Chlorella: DAL101 mit *Chlorella* Kost (n=6), und Wildtyp: C57BL/6 mit normaler Kost (n=8). \*p<0,05: signifikant DAL101 vs. Wildtyp.

Für die Immunhistochemie, wurde das Gehirn für 24 Stunden unbeweglich gemacht, wobei in Paraffin eingelagertes 4%-iges Paraformaldehyd in Natriumperborat verwendet wurde. Die Gewebe wurden zerschnitten und immungefärbt mit:

.)oxidativem Stress Marker,

.)Anti-HNE Antikörper (Kikken Seil Co., Fukuroi, Japan),

.)Glioze-Marker Anti-Iba-1 Antikörper (COVANCE) und

.)Astrozyten-Marker Anti-gliale fibrilläre Säurehaltiges Protein (GFAP) Antikörper (clone GA5; Millipore).

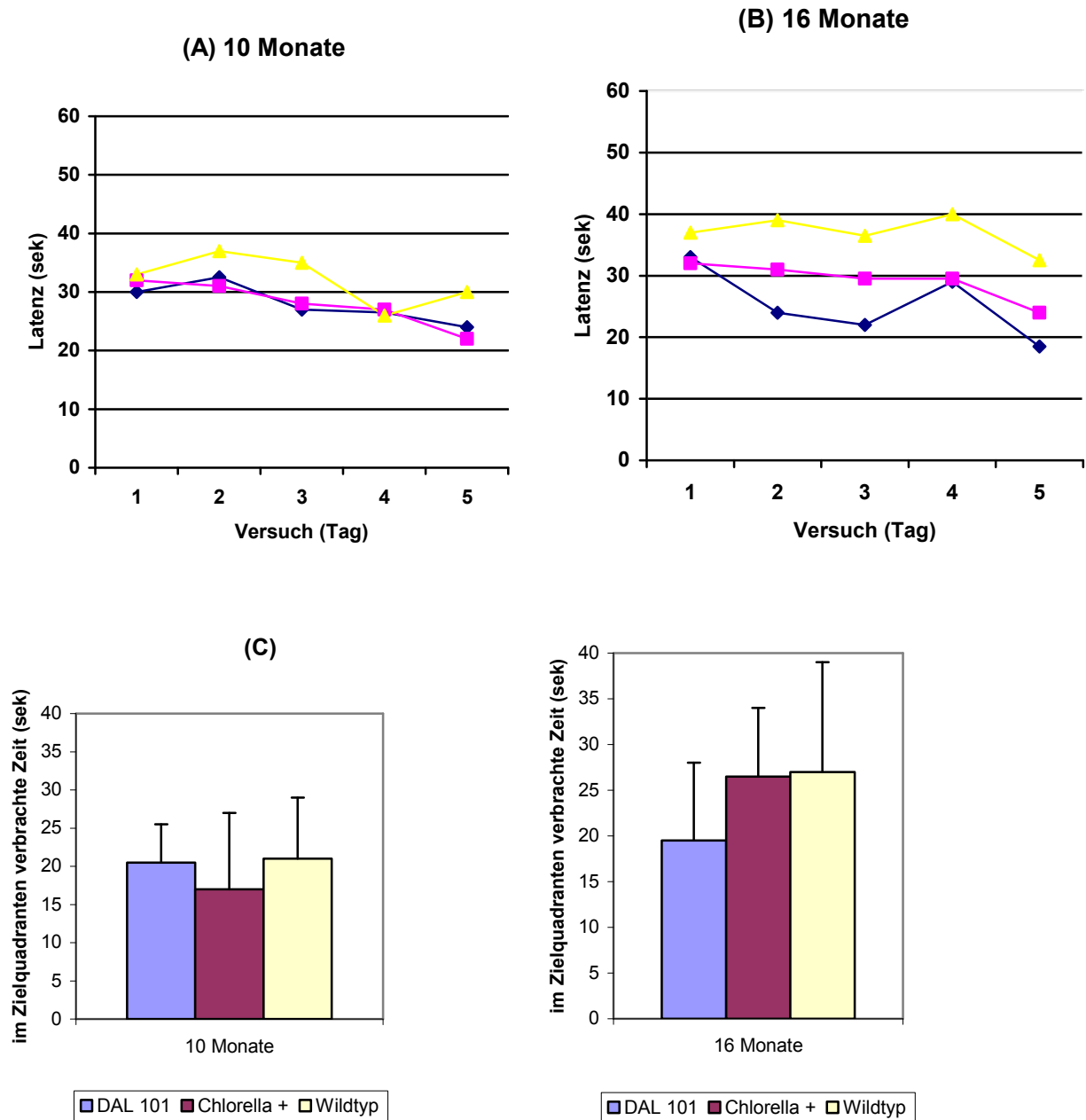
Als alternativer Marker für oxidativen Stress wurden die Malondialdehyd- (MDA) und Hydroxialkenalpiegel (HNA) im Blut bestimmt, unter Verwendung von Bioxytech MDA-586 Assay Kit (Oxisresearch, Oregon, USA), gemäß der Bedienungsanleitung.

Für die statistische Analyse wurden alle Werte als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung bestimmt. Es wurde eine einfache ANOVA (Varianzanalyse) (Fisher's PLSD test) gefolgt von einer Kontrast-Testung verwendet, um die Daten von unterschiedlichen Gruppen zu vergleichen. Als statistische Signifikanz wurde  $p < 0,05$  akzeptiert. Wir führten Quantifizierungsexperimente in Blindstudien durch.

Um die Auswirkungen einer 16-monatigen *Chlorella*-Einnahme in DAL101 Mäusen zu untersuchen, maßen wir sowohl die Gesamtmenge von MDA und HNA im Blut als auch von HNE-positiven Zellen im Gehirn als oxidative Stress Marker. Der MDA und HNA Spiegel im Blut und die HNE-positiven Zellen im Hippokampus waren erheblich höher bei den DAL101 Mäusen, als bei den Wildtyp C57BL/6 Mäusen, wobei die *Chlorella* Kost den oxidativen Stress-Level nicht bedeutend verbesserte (Fig. 1A und B). Dennoch wurde die Anzahl der HNE-positiven Zellen bei der *Chlorella* Kost in der Gyrus Dentatus Region des Hippokampus verringert (Fig. 1C), was darauf hinweist, dass *Chlorella*-Nahrung oxidativen Stress zu verbessern scheint.

Das Körpergewicht von DAL101 Mäusen (männlich und weiblich) neigte dazu, geringer zu sein als das von Wildtyp C57BL/6 Mäusen, was wiederum darauf hindeutet, dass ALDH2-Mangel das Wachstum von Tieren beeinflusst (Ergänzungstabelle 1). Die länger andauernde Einnahme von *Chlorella* verbesserte erheblich das Wachstum der DAL101 Mäuse, und es erreichte das des Wildtyps (Ergänzungstabelle 1), was klar darauf hinweist, dass *Chlorella* einen Nutzen für das Wachstum von DAL101 Mäusen hat.

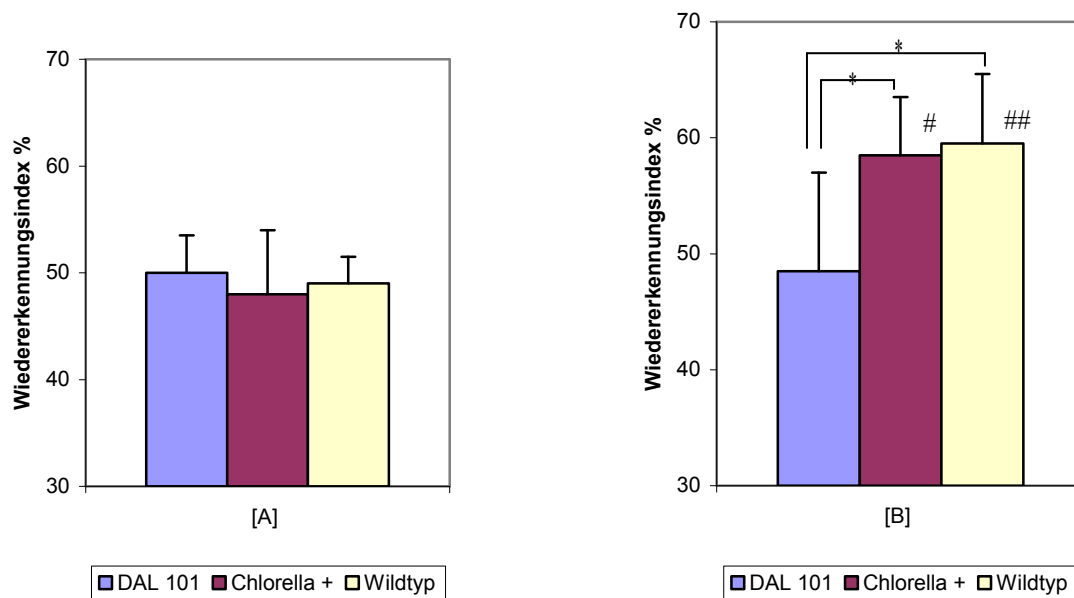
Zuerst wurde der Morris-Wasserlabyrinth Test durchgeführt, um die Auswirkungen von länger andauernder *Chlorella*-Einnahme auf den Verfall von Raumgedächtnis und Lernfähigkeiten von DAL101 Mäusen zu untersuchen. Die körperliche Kraft der männlichen DAL101 Mäusen nahm mit dem Alter markant ab, wie eingangs erwähnt [19]; weibliche DAL101 Mäuse können dem Test jedoch unterzogen werden, da die Schwimmgeschwindigkeit von weiblichen DAL101 Mäusen bis zum Alter von 18 Monaten nicht beeinträchtigt war, wie eingangs berichtet [19]. Ein Trainingsversuch, um eine versteckte Plattform zu finden, wurde während 5 Tagen durchgeführt, und danach wurde die benötigte Zeit, um die Plattform zu erreichen, gemessen (Fig. 2). Nachdem *Chlorella* ab dem Alter von 8 Wochen für 10 Monate gefüttert worden war, gab es keinen Unterschied zwischen der DAL101 Gruppe ohne *Chlorella*, der DAL101 Gruppe mit *Chlorella* und der Wildtyp Gruppe bei der Zeit, die gebraucht wurde, um die Plattform zu erreichen. Wie berichtet [16], sind die DAL101 mit dem Alter von 12 Monaten noch jung (mit 10-monatiger *Chlorella* Kost ab der 8. Lebenswoche), und es traten keine Symptome von Gedächtnisverlust oder kognitivem Verfall auf. Nachdem DAL101 Mäuse 16 Monate gefüttert worden waren, führte man den Morris-Wasserlabyrinth Test durch. In diesem Versuch erreichten DAL101 Mäuse mit *Chlorella* Kost deutlich schneller die versteckte Plattform als DAL ohne *Chlorella* (Fig. 2B). Das ist ein Hinweis darauf, dass die längerfristige Einnahme von *Chlorella* den Verfall im Raumgedächtnis und im räumlichen Lernen unterdrückt. In einem Probeversuch, der einen Tag nach dem 5-tägigen Training durchgeführt wurde, zeigten DAL101 mit *Chlorella* nur eine Tendenz für einen längeren Aufenthalt im Zielquadranten (Fig. 2C).



**Fig.2** Auswirkungen von *Chlorella*- Einnahme auf das Raumgedächtnis und die Lernfähigkeit. Der Morris-Wasserlabyrinth Test wurde durchgeführt nach 10-monatiger (A) und nach 16-monatiger (B) *Chlorella*- Einnahme. Versuche wurden vier Mal täglich wiederholt für 5 Tage, und die benötigte Zeit die Plattform (Latenzzeit) zu erreichen wurde gemessen. Wenn die Tiere innerhalb von 60 Sek. die Plattform nicht erreichten wurde die Latenzzeit als 60 Sek. angerechnet. Geschlossenes Dreieck: DAL101 normale Kost (n=5), geschlossener Karo (im Original Kreis): DAL101 mit *Chlorella* Kost (n=5), und geschlossenes Quadrat: C57BL/6 mit normaler Kost (n=5). (C) Probeversuche nach 10-monatiger und 16- monatiger *Chlorella*- Einnahme. Die Plattform wurde einen Tag nach Abschließung der 5 Tages-Versuche entfernt, und ein 60 Sek. Probeversuch wurde durchgeführt. Die Zeit die im Quadranten, wo ursprünglich die Plattform war, wurde als % zum Wildtyp dargestellt. DAL101: DAL101 normale Kost (n=5), + Chlorella: DAL101 mit *Chlorella* Kost (n=5), und Wildtyp: C57BL/6 mit normaler Kost (n=5). \*p<0,05: signifikant vs. DAL101 (normale Kost).

Als nächstes wurde ein Alternativtest durchgeführt, um die Auswirkungen einer 16-monatigen Einnahme von *Chlorella* zu bestätigen. Der Objekt-Wiedererkennungstest wird nicht beeinflusst durch die physische Fähigkeit, und die Schnüffel-Frequenz war sogar bei alten männlichen DAL101 nicht signifikant verringert (Daten nicht angegeben). Folglich waren beide, männliche und

weibliche DAL101 Mäuse, am Test beteiligt. Während einer 10-minütigen Trainingsperiode erkundeten die Tiere 2 verschiedene Objekte. Als Ergebnis der Trainingsversuche haben alle, die Kontrollgruppe, die Gruppe mit *Chlorella* Behandlung und die normale Gruppe, sich gleich oft an die 2 Objekte angenähert oder an ihnen geschnüffelt (~ 50% vom Wiedererkennungs-Index) (Fig. 3A), was auf vergleichbare Aufmerksamkeit, Motivation und visuelle Wahrnehmung hinweist. Einen Tag nach dem Training wurde eines der konditionierten Objekte durch ein neues Objekt ersetzt. Während eines 5-minütigen Tests näherten sich oder erschnüffelten ältere DAL101 mit normaler Kost das neue Objekt in derselben Frequenz wie das ursprüngliche Objekt (Fig. 3B). Diese Ergebnisse zeigten, dass ältere DAL101 ein Defizit im visuellen Wiedererkennungsgedächtnis aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten Dal101 mit *Chlorella* Kost eine intakte Fähigkeit, das neue Objekt mit einer hohen Frequenz aufzuspüren, und den Level des Wildtyps zu erreichen, was zeigt, dass diesem altersbedingten Defizit im Wiedererkennungsgedächtnis durch die *Chlorella* Kost signifikant vorgebeugt wurde.

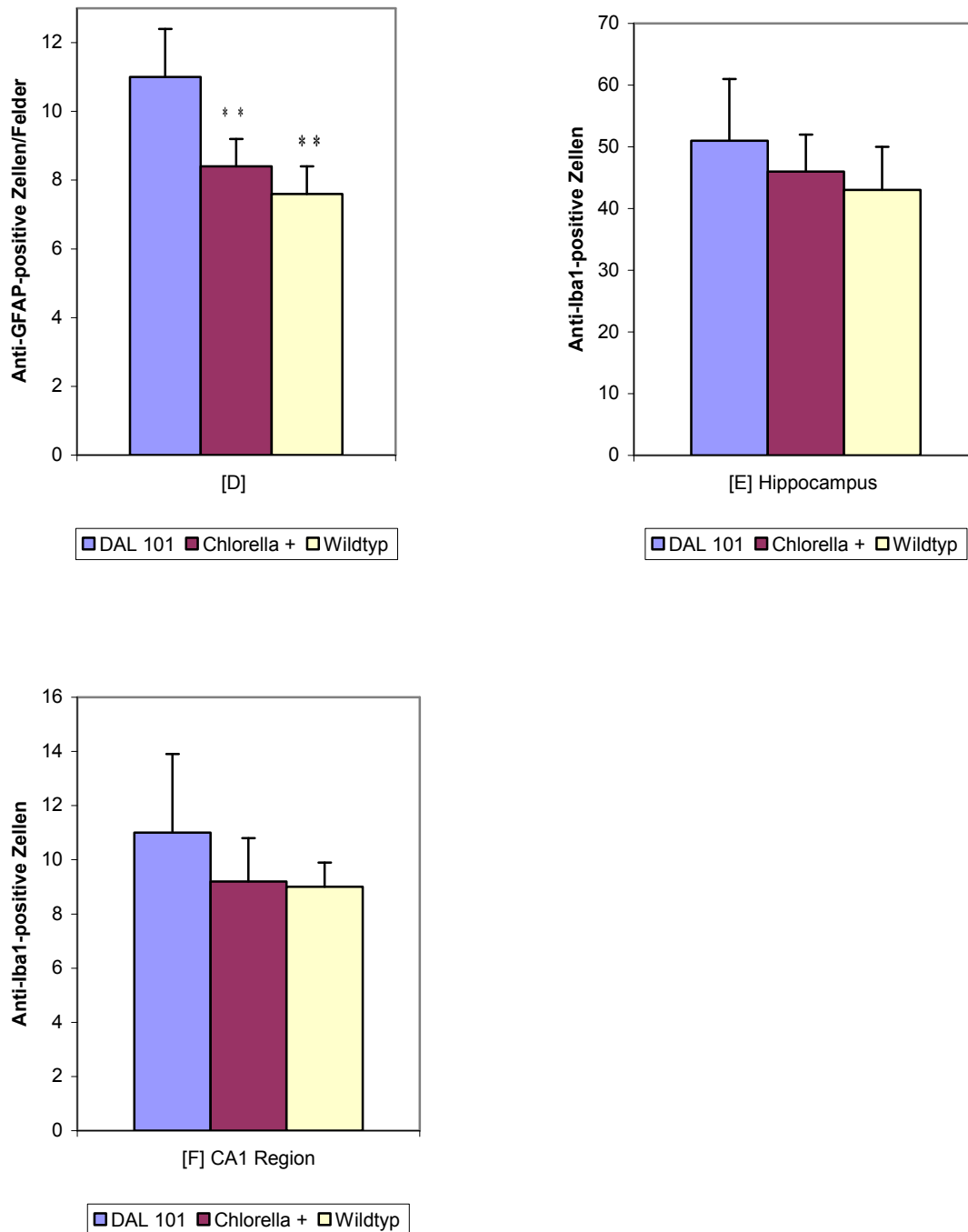


**Fig. 3.** Auswirkungen von *Chlorella* Einnahme auf Wiedererkennungs- und Lernfähigkeit. (A) Das Training für die Objekterkennung Tests wurde nach 16-monatiger *Chlorella* Einnahme durchgeführt. Die Frequenz des explorativen Verhaltens gegenüber 2 Objekten wurde gemessen, und die prozentuellen Verhältnisse der Frequenzen wurden berechnet (Wiedererkennungs-Index). (B) Die Frequenz des explorativen Verhaltens gegenüber 2 Objekten wurde am Tag nach den Trainingsversuchen gemessen, und das Prozentverhältnis der explorativen Verhaltensfrequenz gegenüber dem neuen Objekt wurde berechnet. DAL101: DAL101 normale Kost (n=8) +*Chlorella*: DAL101 mit *Chlorella* Kost (n=5), und Wildtyp: C57BL/6 mit normaler Kost (n=6). \*p<0,05: signifikant vs. DAL101 (normale Kost). \*p<0,05, \*\*p<0,01: signifikant vs. Trainingsversuch.

Eine erhöhte Astrozyten-Aktivierung ist ein Kennzeichen für eine Entzündung und eine Remodellierung der Beeinträchtigung des Gehirns [2]. Um die Auswirkungen von *Chlorella* auf das zentrale Nervensystem bei DAL101 zu untersuchen, wurde die Anzahl der reaktiven Astrozyten in der hippocampalen CA1 Region mittels Immunohistologiefärbung untersucht (Fig.4A-C). Die Anzahl der aktivierten Astrozyten, immungefärbt mit Anti-GFAP Antikörper, in der hippocampalen CA1 Region war bei DAL101 signifikant höher als bei Wildtyp Mäusen (Fig.4D). Andererseits konnten wir bei der Anti-Iba 1 Antikörper-Färbung, einem Marker von Gliose [3], keinen signifikanten Unterschied feststellen (Fig. 4E und F). Da die Anzahl der aktivierten Astrozyten im beschädigten Gehirn ansteigt, könnte das Gehirn der DAL101 Mäuse 16 Monate nach Experimentsbeginn beeinträchtigt worden sein, wahrscheinlich durch beschleunigte

Alterung. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der aktivierten Astrozyten bei DAL101 mit *Chlorella* Kost ähnlich wie die bei den Wildtyp Mäusen, was ein Hinweis darauf ist, dass *Chlorella* eine Gehirnentzündung bei DAL101 Mäusen verhinderte (Fig.4D).

- (A) Abbildung: DAL 101, normale Kost
- (B) Abbildung: DAL 101, *Chlorella* Kost
- (C) Abbildung: Wildtyp, normale Kost



**Fig. 4.** Auswirkungen von *Chlorella* auf die Aktivierung von Astrozyten. Die aktivierten Astrozyten in der hippocampalen CA1 Region wurden unter Verwendung von Anti-GFAP und Anti-Iba 1 Antikörper nach 16-monatiger *Chlorella* Einnahme immungefärbt. Repräsentative Bilder sind dargestellt (A, B und C). Die Pfeile weisen auf die aktivierten Astrozyten hin. Massstabsbalken: 100µm. (A) DAL101 (normale Kost), (B) DAL101 (*Chlorella* Kost), und (C) Wildtyp (C57BL/6 mit normaler Kost). (D) Positive Zellen wurden in einem einzigen sichtbaren Bereich in der hippocampalen CA1 Region in einer Blindstudie gezählt. (E) und (F) zeigen Anti-Iba 1-positive Zellen im Hippocampus und in der CA1 Region, in Bezug auf DAL101: DAL101

normale Kost (n=8), +Chlorella: DAL101 mit *Chlorella* Kost (n=7), und Wildtyp: C57BL/6 mit normaler Kost (n=6). \*\*p<0,01: signifikant vs.DAL101 (normale Kost).

Wir untersuchten die Auswirkungen einer langfristigen Einnahme von *Chlorella* auf oxidativen Stress, Körpergewicht, altersbedingte kognitive Fähigkeit und auf das zentrale Nervensystem, und fanden heraus, dass *Chlorella* unter allen Gesichtspunkten Vorteile hat.

Die Alzheimer Krankheit manifestiert sich in einem geschädigten Gedächtnis und führt letztlich zu massiver Demenz durch fortschreitende Gedächtnis-/kognitive Störung. Da DAL101 eine kürzere Lebensspanne, altersbedingte Neurodegeneration, Hyperphosphorylation von Tau und einen Rückgang bei der kognitiven Fähigkeit aufwies, ist diese Mustermouse geeignet, um Nahrung zu untersuchen, die der Demenz bei langfristiger Fütterung vorbeugend entgegenwirkt [16]. Wir untersuchten die Auswirkungen einer 16-monatigen *Chlorella*-Einnahme auf das räumliche Lernen/Gedächtnis (Morris-Wasserlabyrinth Test) und die Objekt-Wiedererkennungs-Fähigkeit (neuer Objekt-Wiedererkennungs-Test) unter Verwendung von DAL101 Mäusen, und fanden heraus, dass die langfristige Einnahme von *Chlorella* vorbeugend auf kognitive Schäden bei DAL101 wirkt.

Vermehrte aktivierte Astrozyten sind ein Kennzeichen für Entzündung und Remodellierung [2]. Eine langfristige Einnahme von *Chlorella* reduzierte signifikant die aktivierten Astrozyten in der hippocampalen CA1 Region bei älteren DAL101, was bedeutet, dass *Chlorella* Entzündung zu unterdrücken vermag, möglicherweise aufgrund ihrer anti-oxidativen Fähigkeit.

DAL101 können Aldehyde, wie das 4-HNE, nicht effizient abbauen, da ihre ALDH-Aktivität unterdrückt ist [16, 17]. Eine Zunahme im 4-HNE Level bei Patienten mit leichter kognitiver Störung und Alzheimer Anfangsstadium, verglichen mit dem von gesunden Personen, wurde berichtet [32], was mit den Ergebnissen bezüglich der oxidativen Stress Marker in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit übereinstimmt [20]. Zudem wurde eine Erhöhung des oxidativen Stress-Niveaus bei einer Mustermouse mit Alzheimer Krankheit mit Amyloid  $\beta$ -Protein (A $\beta$ ) Ablagerungen beobachtet [21]. Basierend auf diesen Forschungsergebnissen scheint der oxidative Stress vor dem Ausbruch der Alzheimer Krankheit eine entscheidende Rolle zu spielen.

*Chlorella* ist reich an Chloroplasten, wobei Plastochinon Ubichinon als Elektronträger in der photosynthetischen Elektronen-Transport Kette ersetzt. Plastochinon zeigt die besseren antioxidativen Eigenschaften, wie aus chemischen Experimenten hervorgeht [7], und ist innerhalb eines weiten Konzentrationsspektrums nicht durch die Gefahr prooxidativer Effekte verkompliziert [27]. Es ist möglich, dass Plastochinon ein besseres Antioxidant ist, um kognitivem Verfall vorzubeugen.

Es wurde berichtet, dass ein erhöhter Homocysteinspiegel im Blut ein Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankung, Schlaganfall und Alzheimer ist [25]. Es wurde auch berichtet, dass ein erhöhter Homocysteinspiegel im Blut verbunden mit einem Folsäure-Defizit, die Zytotoxizität von A $\beta$  in einer Alzheimer Mustermouse, in der sich A $\beta$  ansammelt, erhöhte [8]. Eine zu geringe Folsäure-, Vitamin B6- und Vitamin B12- Zufuhr steigert das Homocystein [9]. *Chlorella* ist reich an Folsäure (1000-3000 $\mu$ g/100g), zusätzlich zu den Antioxidantien [22, 26]. Demnach kann man annehmen, dass *Chlorella* die kognitive Fähigkeit bei DAL101 Mäusen durch die Interaktion von Folsäure und Antioxidantien verbessert. Selbst wenn ein einzelnes diätetisches Antioxidant keine vorbeugende Auswirkung zeigt, so könnten mehrfach zusammengesetzte wie *Chlorella* effizient sein, um altersbedingten Störungen vorzubeugen.

## Anhang A. Zusatzangaben

Zusatzangaben im Zusammenhang mit diesem Artikel sind in der Online-Version zu finden, bei doi: 10.1016/j.neulet.2009.08.044

## Literaturverzeichnis



- [1] T. Hasegawa, Y. Kimura, K. Hiromastu, N. Kobayashi, A. Yamada, M. Makino, M. Okuda, T. Sano, K. Nomoto, Y. Yoshikai, Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*, *Immunopharmacology* 35 (1997) 273-282.
- [2] O. Isacson, W. Fischer, K. Wictorin, D. Dawbarn, A. Bjorklund, Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat, *Neuroscience* 20 (1987) 1043-1056.
- [3] D. Ito, Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi, S. Kohsaka, Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 57 (1998) 1-9.
- [4] S.A. Jo, E.K. Kim, M.H. Park, C. Han, H.Y. Park, Y. Jang, B.J. Song, I. Jo, A Glu487Lys polymorphism in the gene for mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 is associated with myocardial infarction in elderly Korean men, *Clin. Chim. Acta* 382 (2007) 43-47.
- [5] K. Kamino, K. Nagasaka, M. Imagawa, H. Yamamoto, H. Yaneda, A. Ueki, S. Kitamura, K. Namekata, T. Miki, S. Ohta, Deficiency in mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases the risk for late-onset Alzheimer's disease in the Japanese population, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273 (2000) 192-196.
- [6] F. Konishi, K. Tanaka, K. Himeno, K. Taniguti, K. Nomoto, Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes, *Cancer Immunol. Immunother.* 19 (1985) 73-78.
- [7] J. Kruk, M. Jemiola-Rzeminska, K. Strzalka, Plastoquinol and alpha-tocopherol quinol are more active than ubiquinol and alpha-tocopherol in inhibition of lipid peroxidation, *Chem. Phys. Lipids* 87 (1997) 73-80.
- [8] I.I. Kruman, T.S. Kumaravel, A. Lohani, W.A. Pedersen, R.G. Cutler, Y. Kruman, N. Hanghey, J. Lee, M. Evans, M.P. Mattson, Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 22 (2002) 1752-1762.
- [9] R. Leboeuf, Homocysteine and Alzheimer's disease, *J. Am. Diet Assoc.* 103 (2003) 304-307.
- [10] H.S. Lee, C.Y. Choi, C. Cho, Y. Song, Attenuating effect of chlorella supplementation on oxidative stress and NFkappaB activation in peritoneal macrophages and liver of C57Bl/6 mice fed on an atherogenic diet, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67 (2003) 2083-2090.
- [11] M.A. Lovell, W.D. Ehmann, M.P. Mattson, W.R. Markesbery, Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 18 (1997) 457-461.
- [12] A. Maczurek, K. Hager, M. Kenklies, M. Sharman, R. Martins, J. Engel, D.A. Carlson, G. Munich, Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1463-1470.
- [13] M.P. Mattson, Pathways towards and away from Alzheimer's disease, *Nature* 430 (2004) 631-639.
- [14] R.G. Morris, P. Garrud, J.N. Rawlins, J. O'Keefe, Place navigation impaired rats with hippocampal lesions, *Nature* 297 (1982) 681-683.
- [15] I. Ohsawa, K. Nishimaki, C. Yasuda, K. Kamino, S. Ohta, Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells, *J. Neurochem.* 84 (2003) 1110-1117.
- [16] I. Ohsawa, K. Nishimaki, Y. Murakami, Y. Suzuki, M. Ishikawa, S. Ohta, Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial ALDH2 activity, *J. Neurosci.* 28 (2008) 6239-6249.
- [17] S. Ohta, I. Ohsawa, Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification, *J. Alzheimer's Dis.* 9 (2006) 155-166.
- [18] S. Ohta, I. Ohsawa, K. Kamino, F. Ando, H. Shimokata, Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011 (2004) 36-44.

- [19] D. Pratico, Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 70-78.
- [20] D. Pratico, C.M. Clark, F. Liun, Rokach, V.Y. Lee, J.Q. Trojanowski, Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 59 (2002) 972-976.
- [21] D. Pratico, K. Uryu, S. Leight, J.Q. Trojanoswki, V.M. Lee, Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis, *J. Neurosci.* 21 (2001) 4183-4187.
- [22] R. Pratt, E. Johnson, Production of thiamine, riboflavin, folic acid, and biotin by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*, *J. Pharm. Sci.* 54 (1965) 871-874.
- [23] M. Sano, H. Grossmann, K. Van Dyk, Preventing Alzheimer's disease: separating fact from fiction, *CNS Drugs* 22 (2008) 887-902.
- [24] C. Schneider, K.A. Tallmann, N.A. Porter, A.R. Brash, Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanism of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20831-20838.
- [25] S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P.F. Jacques, I.H. Rosenberg, R.B. D'Agostino, P.W. Wilson, P.A. Wolf, Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 476-483.
- [26] S. Shibata, Y. Natori, T. Nishihara, K. Tomisaka, K. Matsumoto, H. Sansawa, V.C. Nguyen, Antioxidant and anti-cataract effects of chlorella on rats with streptozotocin induced diabetes, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 49 (2003) 334-339.
- [27] V.P. Skulachev, V.N. Anisimov, Y.N. Antonenko, L.E. Bakeeva, B.V. Chernyak, V.P. Elichev, O.F. Filenko, N.I. Kalinina, V.I. Kapelko, N.G. Kolosova, B.P. Kopnin, G.A. Korshunova, M.R. Lichinitser, L.A. Obukhova, E.G. Pasyukova, O.I. Pisarenko, V.A. Roginsky, E.K. Ruuge, I.I. Severina, M.V. Skulachev, I.M. Spivak, V.N. Tashlitsky, V.A. Tkachuk, M.Y. Vyssokikh, L.S. Yaguzhinsky, D.B. Zorov. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochem. Biophys. Acta* 1787 (2009) 437-461.
- [28] K. Tanaka, T. Koga, F. Konishi, M. Nakamura, M. Mitsuyama, K. Himeno, K. Nomoto, Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection, *Infect. Immun.* 53 (1986) 267-271.
- [29] K. Uchida, 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress, *Prog. Lipid Res.* 42 (2003) 318-343.
- [30] B. Wang, J. Wang, S. Zhou, S. Tan, X. He, Z. Yang, Y.C. Xie, S. Li, C. Zheng, X. Ma. The association of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) polymorphism with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease in Chinese, *J. Neurol. Sci.* 268 (2008) 172-175.
- [31] H. Wang, G.D. Ferguson, V.V. Pineda, P. E. Cundiff, D. R. Storm, Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 635-642.
- [32] T.I. Williams, B.C. Lynn, W.R. Markesbery, M.A. Lovell, Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging* 27 (2006) 1094-1099.
- [33] A. Yoritaka, N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, E.R. Stadtman, Y. Mizuno, Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 2696-2701.