

**Der Einfluss von Raloxifen und Hormonersatztherapie auf
Serummarker des Cholesterinmetabolismus bei postmenopausalen Frauen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von:

Ursula-Martina Pinsdorf

geb. Pieczewski

aus:

Bonn

2005

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privat-Dozent Dr. rer. nat. Dr. med. sci. Dieter Lütjohann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Klingmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 2005

Aus der Abteilung für klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus von Bergmann

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	5
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
1.1 Der Cholesterinstoffwechsel	7
<i>1.1.1 Die Cholesterinbiosynthese und Sterinresorption</i>	7
<i>1.1.2 Der Cholesterinabbau</i>	9
<i>1.1.3 Der Cholesterinstoffwechsel im Gehirn</i>	10
1.2 Cholesterin und Atherosklerose	11
1.3 Cholesterin und Apolipoprotein E	12
1.4 Alzheimer Demenz	13
<i>1.4.1 Krankheitsbild und Pathophysiologie der Alzheimer Demenz</i>	13
<i>1.4.2 Alzheimer Demenz und Cholesterinstoffwechsel</i>	14
1.5 Steroidale Sexualhormone	16
<i>1.5.1 Biosynthese und Abbau der Sexualhormone</i>	16
<i>1.5.2 Östrogenrezeptoren und Östrogenwirkungen</i>	18
<i>1.5.3 Konjugierte equine Östrogene</i>	19
<i>1.5.4 Progesteron und Medroxyprogesteronacetat</i>	20
1.6 Hormonersatztherapie und Fettstoffwechsel – vaskuläres Risiko	21
1.7 Hormonersatztherapie - Kognition und Demenz	23
1.8 Raloxifen	24
1.9 Fragestellung	27
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Studienteilnehmer	28
2.2 Randomisierung und Studiendesign	30
2.3 Probennahme und Probenasservierung	30
2.4 Materialien	31
<i>2.4.1 Instrumentelle Ausstattung</i>	31
<i>2.4.2 Reagenzien</i>	32
2.5 Probenaufarbeitung	32
2.6 Beschreibung der Analyseverfahren	34
<i>2.6.1 Gaschromatographie</i>	34
<i>2.6.2 Flammenionisationsdetektion</i>	35
<i>2.6.3 Massenselektive Detektion</i>	35
2.7 Durchführung der Analysen	40
<i>2.7.1 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion</i>	40
<i>2.7.2 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-massenselektiver Detektion</i>	42
2.8 Statistik	47

3. ERGEBNISSE	50
3.1 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf – graphische Darstellung und Interpretation der Ergebnisse	50
3.1.1 Serumkonzentrationen von Cholesterin	50
3.1.2 Serumkonzentrationen von Lathosterin und seiner Ratio zu Cholesterin	51
3.1.3 Serumkonzentrationen von Lanosterin und seiner Ratio zu Cholesterin	52
3.1.4 Serumkonzentrationen von Desmosterin und seiner Ratio zu Cholesterin	54
3.1.5 Serumkonzentrationen von Cholestanol und seiner Ratio zu Cholesterin	55
3.1.6 Serumkonzentrationen von 24S-Hydroxycholesterin und seiner Ratio zu Cholesterin	56
3.1.7 Serumkonzentrationen von 27-Hydroxycholesterin und seiner Ratio zu Cholesterin	58
3.1.8 Serumkonzentrationen von Campesterin und seiner Ratio zu Cholesterin	59
3.1.9 Serumkonzentrationen von Sitosterin und seiner Ratio zu Cholesterin	61
3.2 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf – tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	62
4. DISKUSSION	80
5. ZUSAMMENFASSUNG	85
6. LITERATURVERZEICHNIS	87
DANKSAGUNG	106
LEBENS LAUF	107

ABKÜRZUNGEN

A β	β -Amyloid
ACAT	Acyl-Coenzym A:Cholesterol Acyltransferase
ANCOVA	Varianzanalyse für wiederholte Messungen mit Kovariate(n)
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
APP	Amyloid Precursor Protein
ApoE	Apolipoprotein E
BHT	3.5-di-tert-Butyl-4-Hydroxy-Toluol
BMI	Body Mass Index
CASI	Cognitive abilities screening instrument
CEE	Conjugated equine estrogens - konjugierte equine Östrogene
Cyp 7A1	Cholesterin-7 α -Hydroxylase
Cyp 46	Cholesterin-24(S)-Hydroxylase
Cyp27A1	Sterin-27-Hydroxylase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EOAD	Early-onset Alzheimer Demenz
ER α , β	Östrogenrezeptor α , β
ERE	Estrogen response element – Östrogenbindungsstelle
FID	Flammenionisationsdetektion
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GC	Gaschromatographie
HDL-C	High-density lipoprotein Cholesterin
HRT	Hormone replacement therapy – Hormonersatztherapie
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A
ISTD	Interner Standard
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL-C	Low-density lipoprotein Cholesterin
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasinghormon
LOAD	Late-onset Alzheimer Demenz
Lp(a)	Lipoprotein (a)
MMSE	Mini mental state examination
MPA	Medroxyprogesteronacetat
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

MS	Massenspektrometrie
MSD	Massenselektive Detektion
NO	Stickoxid
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PRA, PRB	Progesteronrezeptoren A, B
RRE	Raloxifen response element, Raloxifenbindungsstelle
RCT	Recall Cognitive Trial
Rt	Retentionszeit
Rlx60; Rlx150	Raloxifen 60mg; Raloxifen 150 mg
SERM	Selektiver Östrogen Rezeptor Modulator
SHBG	Sexualhormon bindendes Globulin
SIM	Selected ion monitoring
SPECT	(single) Protonen-Emmission-Computer-Tomographie
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences – Statistikprogramm
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Der Cholesterinstoffwechsel

1.1.1 Die Cholesterinbiosynthese und Sterinresorption

Wenige organische Moleküle haben ein so intensives und anhaltendes wissenschaftliches Interesse auf sich gelenkt wie das Cholesterin. Es ist das Paradebeispiel einer Janus-köpfigen Substanz, der Bösewicht, der einerseits Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht, andererseits aber auch für den Aufbau von Zellmembranen lebensnotwendig ist (Bloch, 1992). Im gesunden menschlichen Organismus stehen körpereigene Synthese, intestinale Aufnahme über die Nahrung, Veresterung durch spezifische Enzyme, extrazellulärer Transport mittels Lipoproteinen, und biliäre Ausscheidung des Cholesterins - in unveränderter oder in metabolisierter Form als Gallensäuren - miteinander im Gleichgewicht. Cholesterin ist ein sehr hydrophobes Molekül mit einer begrenzten Polarität aufgrund der β -ständigen Hydroxylgruppe am C3-Atom (Abb.1). Durch seine Hydrophobizität bestimmt es wesentlich die Zellmembranfluidität. Auf der anderen Seite macht diese Lipophilizität des Cholesterins spezielle Mechanismen für seinen Transport in wässriger Umgebung notwendig.

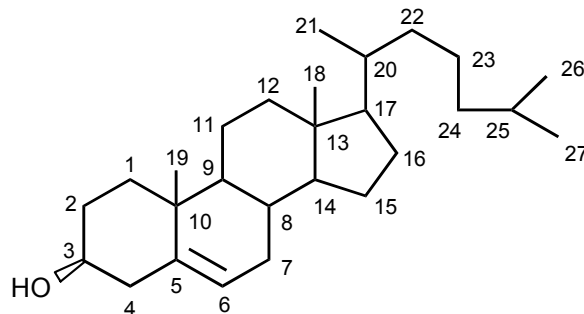


Abb. 1 Strukturformel von Cholesterin (Cholest-5-en-3 β -ol); die C-Atome sind systematisch durchnummeriert (Fieser und Fieser, 1961)

Cholesterin wird aus Acetyl-CoA-Einheiten innerhalb des Mevalonsäurestoffwechsels synthetisiert. Die Synthese beginnt mit der Bildung von 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) aus Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA. Das HMG-CoA wird danach zu Mevalonsäure reduziert. Dieser geschwindigkeitbestimmende irreversible Schritt wird durch die HMG-CoA-Reduktase reguliert (Goldstein und Brown, 1990). Die weiteren, hier nicht näher beschriebenen Syntheseschritte, schließen unter anderen die Umwandlung von Mevalonsäure in Isopentenylpyrophosphat, die Kondensation zu Squalen und die endgültige Zyklisierung von Squalen zu Lanosterin ein, welches die erste steroidale Vorstufe in der

mehrstufigen Kaskade der Cholesterinbiosynthese darstellt (Abb. 2).

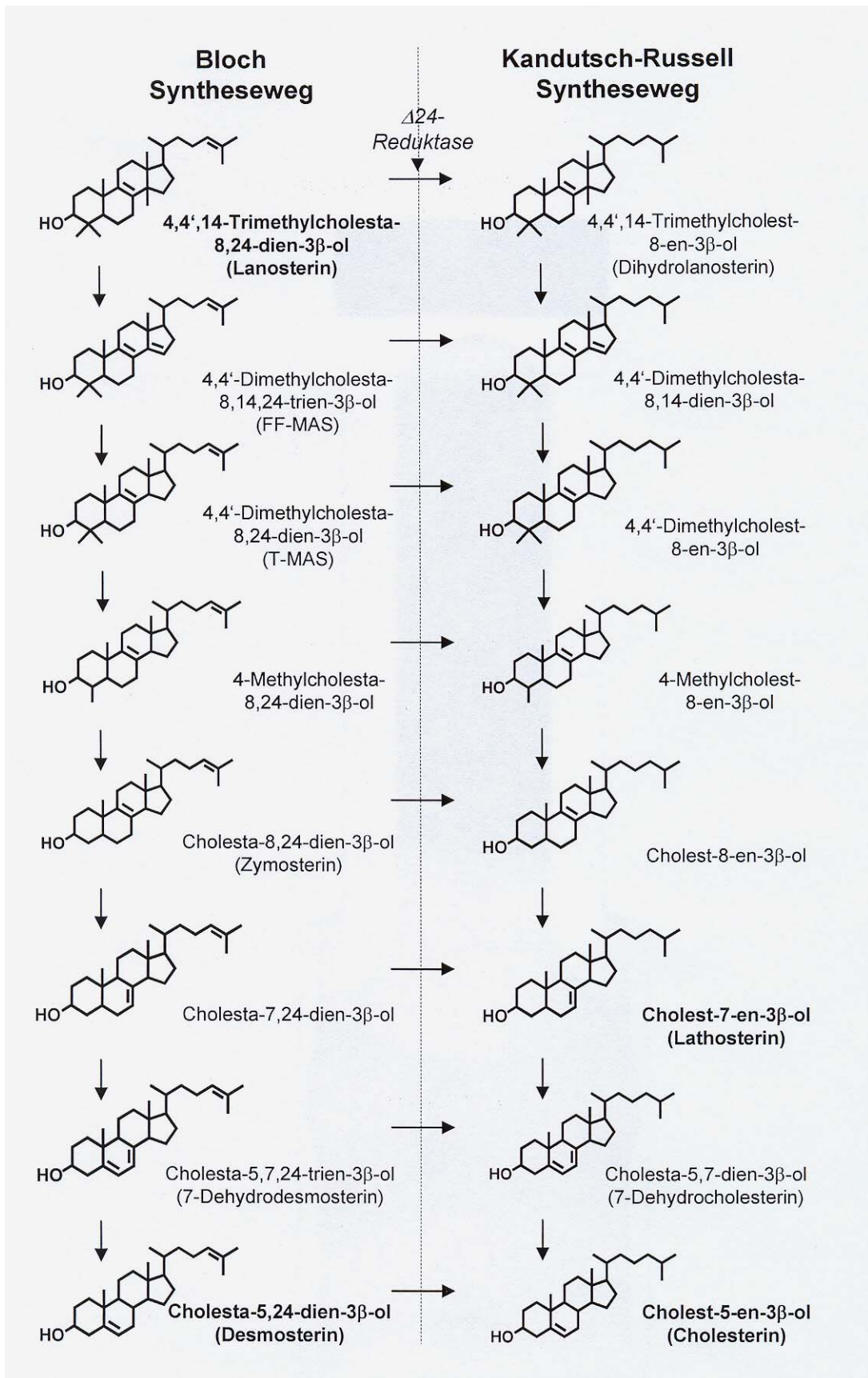


Abb. 2

Steroidale Vorstufen der Cholesterinbiosynthese (modifiziert nach (Lütjohann et al., 2002))

Häufig werden die absoluten Konzentrationen an Cholesterinvorstufen bzw. deren Ratio zu Cholesterin zur Beschreibung der Cholesterinbiosynthese in organischen Materialien wie Blut, Liquor, Fäzes oder Organpräparaten herangezogen. Die Serumkonzentrationen von Lanosterin, Desmosterin oder Lathosterin reflektieren die Aktivität der hepatischen HMG-CoA Reduktase (Björkhem et al., 1987; Kempen et al., 1988; Miettinen et al., 1990; Reihner et al., 1990). Neben Cholesterin und seinen endogenen Vorstufen findet man in Serum, Liquor und Organellen Strukturanaloga des Cholesterins, die pflanzlichen Sterine. Sie unterscheiden sich von Cholesterin durch zusätzliche Methyl (Campesterin)- oder Äthyl- (Sitosterin) gruppierungen am C24-Atom der Seitenkette des Cholesteringerüsts. Diese Phytosterine können dem menschlichen Körper nur über die Nahrung zugeführt werden und werden größtenteils sehr rasch über sogenannte selektive ATP-bindende Kassettentransporter (ABCG5/G8) vom Enterozyten direkt oder im Hepatozyten über die Galle in den Darm ausgeschieden (Berge et al., 2002; Lee et al., 2001; Yu et al., 2004). Die Aufnahmerate der Phytosterine im Dünndarm ist deutlich geringer als die des Cholesterins. Mit zunehmender Lipophilität nimmt die Resorptionsrate für Sterine ab. Cholesterin wird zwischen 20-70%, Campesterin mit ca. 15% und Sitosterin zu weniger als 5% resorbiert. Das Verhältnis (Ratio) von Campesterin oder Sitosterin zu Cholesterin im Serum stellt ein Surrogatserum- oder plasmamarker für die Cholesterinresorptionsrate dar (Miettinen et al., 1990). Findet man in einem gesunden Organismus einen sehr hohen Gehalt an pflanzlichen Sterinen, so weist dies auf eine allgemein erhöhte Resorptionsrate für Sterine, insbesondere für Cholesterin hin. Die Konzentrationen o.g. Cholesterinvorstufen und pflanzlicher Sterine werden heutzutage mittels hochsensitiver und -selektiver Methoden wie z.B. der massenspektrometrischen Detektion nach gas- oder flüssigkeitschromatographischer Separierung der Sterine bestimmt.

1.1.2 Der Cholesterinabbau

Cholesterin ist im gesunden Organismus Vorstufe von Gallensäuren und Steroidhormonen. Die komplette Synthese der Gallensäuren findet in der Leber statt, Vorstufen findet man jedoch auch in anderen Zellen. Eines der bedeutendsten Enzyme der Gallensäurensynthese ist die hepatische Cholesterin 7 α -Hydroxylase (Cyp 7A1). Sie steuert den initialen und geschwindigkeitbestimmenden Schritt im „klassischen“ (neutralen) Weg der Gallensäurenbiosynthese des Säugerorganismus (Princen et al., 1997; Russell, 2000). Die Sterin 27-Hydroxylase (Cyp 27A1) katalysiert die Hydroxylierung verschiedener Sterinsubstrate, einschliesslich Cholesterin, zur Synthese von 27-Hydroxycholesterin und weiteren Intermediaten der Gallensäurenbiosynthese (Andersson et al., 1989; Cali und

Russell, 1991; Russell, 2000; Wikvall, 1984). Diese und weitere Reaktionen bilden den „sauren“ Weg der Gallensäurenbiosynthese (Abb. 3).

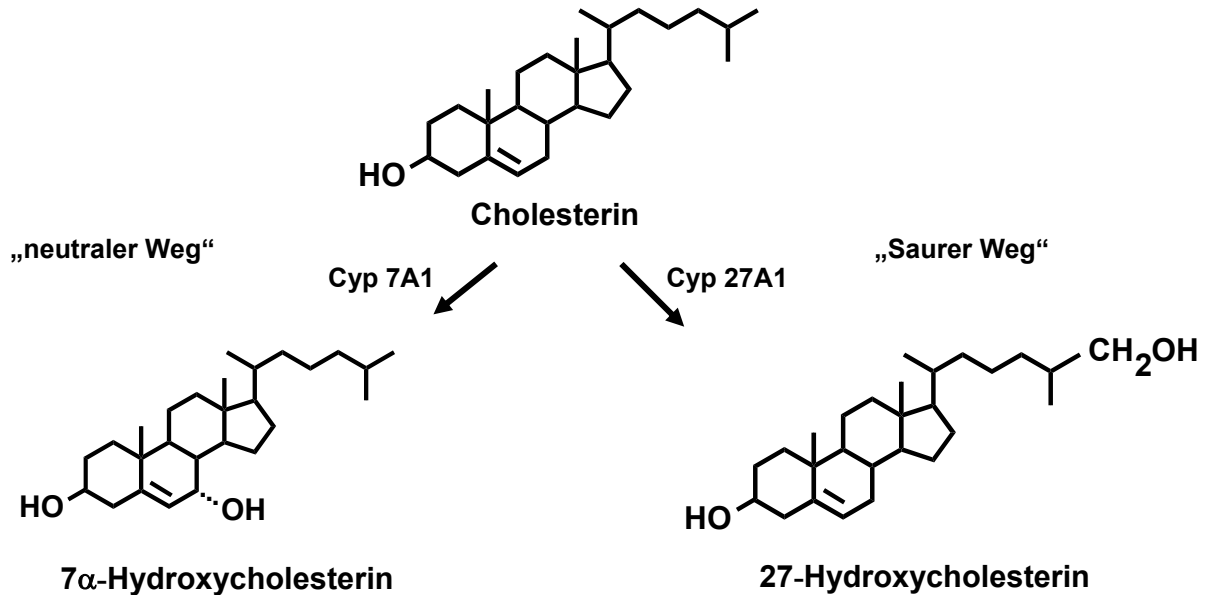


Abb. 3 Die ersten Schritte des „neutralen“ und „sauren Weges“ zur Bildung von Gallensäuren

Häufig werden die Serumkonzentrationen von 7α-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin als biochemische Marker zur Beschreibung der Gallensäurensynthese und somit der Aktivität der entsprechenden Enzyme, Cyp7A1 bzw. Cyp27A1, verwendet. Im Gegensatz zu Cholesterin sind Gallensäuren oder Gallensalze (im alkalischen Milieu) wesentlich polarer. Die hauptsächliche Funktion von Gallensäuren ist ihre physiologische Bedeutung als Detergentien: sie sind für die Mizellenbildung bei der Aufnahme von Nahrungslipiden, Cholesterin oder pflanzlichen Sterinen, und lipophilen Vitaminen notwendig und bereiten sie so für die Resorption im Dünndarm vor.

1.1.3 Der Cholesterinstoffwechsel im Gehirn

Über viele Jahre hinweg wurde der Cholesterinstoffwechsel im Gehirn weitgehend ignoriert, da dieses Organ für die Sterinökonomie im gesamten Organismus von geringer Bedeutung ist und nicht auf die Kontrollmechanismen reagiert, die für die Einhaltung des Steringleichgewichtes in den meisten anderen Organen, hauptsächlich in der Leber, verantwortlich sind (Dietschy und Turley, 2001). Jedoch müssen Neurone, wie alle anderen Zelltypen auch, kontinuierlich mit freiem Cholesterin versorgt werden, welches entweder

intrazellulär durch *de novo* Synthese entsteht oder aus der extrazellulären Umgebung unter Verwendung spezifischer Liganden und Membrantransporter aufgenommen wird (de Chaves et al., 1997). Nahezu ein Viertel des nicht-veresterten Gesamtkörper-Cholesterins ist im zentralen Nervensystem (ZNS) enthalten, obwohl dieses nur ungefähr 2% der Gesamtkörpermasse ausmacht. Sehr wenig Cholesterin (<1%) wird von zirkulierenden Lipoproteinen über die protektive Blut-Hirn-Schranke aufgenommen (Dietschy und Turley, 2004). Neben einem geringen Abtransport über Lipoproteine, insbesondere über Apolipoprotein E, muss es für Cholesterin weitere Möglichkeiten geben, die Blut-Hirn-Schranke zu seiner Elimination zu überwinden (Pitas et al., 1987).

In Analysen menschlicher Gewebe wurde gefunden, dass das Gehirn annähernd 90% des Gesamtkörpergehaltes an 24S-Hydroxycholesterin enthält. Dabei kommt das 24-Hydroxycholesterin im Gehirn, in der Leber, in den Nebennieren und im Plasma nur als 24S-Stereoisomer vor (Lin und Smith, 1974). Aus der arterio-venösen Differenz (Arteria Carotis interna - Vena jugularis interna) der Konzentrationen an nicht-sulfatidiertem, d.h. freiem (29%) und fettsäureverestertem (71%) 24S-Hydroxycholesterin im Plasma, wurde der Netto-Gesamtfluss vom Gehirn in die Peripherie bei 12 Erwachsenen zu ungefähr 6.4 mg/24 Stunden berechnet (Björkhem et al., 1998; Lütjohann et al., 1996). Die Vermutung, dass es sich um ein Enzym der Cytochrom-P450 Familie handelt, das die Umwandlung von Cholesterin in 24S-Hydroxycholesterin bewirkt, konnte schliesslich durch cDNS-Klonierung der Cholesterin-24-Hydroxylase, auch Cyp46 genannt, bewiesen werden. (Lund et al., 1999). 24S-Hydroxycholesterin, welches sich als Umwandlungs- und Transportform für Cholesterin aus dem Gehirn via Blut-Hirn-Schranke zur Peripherie zeigt, wird zunehmend als Liquor- oder Plasmamarker für das Cholesteringleichgewicht bzw. für seine Regulation im menschlichen Gehirn verwendet (Björkhem et al., 2001; Bretillon et al., 2000a; Bretillon et al., 2000b; Fassbender et al., 2002; Holdenrieder et al., 2004; Kölsch et al., 2004; Kölsch et al., 2002; Kölsch et al., 2003; Lütjohann et al., 2001; Lütjohann et al., 1996; Lütjohann et al., 2000; Lütjohann et al., 2004; Lütjohann und von Bergmann, 2003; Papassotiropoulos et al., 2002; Papassotiropoulos et al., 2000; Schönknecht et al., 2002).

1.2 Cholesterin und Atherosklerose

Durch die Hydrophobizität des Cholesterins, welche seinen Abtransport in wässriger Umgebung erschwert, wird der Cholesteringehalt im Plasma gesteigert und letztlich die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigt. Die Atherosklerose ist eine Voraussetzung für die meisten Fälle der koronaren Herzkrankheit, welche wiederum Ursache für nahezu 50%

der Todesfälle in industriellen Ländern ist (Grundy, 1986). Es gibt überzeugende epidemiologische Daten, die eine Korrelation zwischen dem Plasmacholesteringehalt in den verschiedenen Lipoproteinfraktionen und dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit bestätigen (Abbott et al., 1984; Assmann et al., 1996; Wilson et al., 1983). Generell wird angenommen, dass die Richtung des Cholesterintransportes im menschlichen Körper dergestalt reguliert wird, dass das low-density lipoprotein (LDL) ein Transportmedium zur Cholesterinversorgung peripherer Zellen (z.B. Makrophagen) ist, wohingegen das high-density lipoprotein (HDL) für den umgekehrten Cholesterintransport von der Peripherie zu exkretorischen Organen, wie der Leber, verantwortlich ist. Diese Ansicht jedoch ist seit einiger Zeit erneut in die Diskussion gekommen, da es einige Hinweise darauf gibt, dass der Plasma HDL-Cholesteringehalt nicht alleine oder ausschließlich für diesen Reverse-Cholesterintransport zuständig ist (Groen et al., 2001; Groen et al., 2004; Osono et al., 1996).

1.3 Cholesterin und Apolipoprotein E

Der Lipidtransporter Apolipoprotein E (ApoE), ein Protein aus 299 Aminosäuren liegt in drei Allelen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4, vor. Das Vorliegen mindestens eines $\epsilon 4$ Allels geht mit einem erhöhten Cholesterinspiegel einher. (Lütjohann et al., 2002). ApoE nimmt, besonders im menschlichen Gehirn, wo Apolipoproteine wie das ApoA1 und das ApoB nur in unbedeutenden Mengen vorliegen, eine Schlüsselstellung im Cholesterintransport ein. Während es im peripheren Nervensystem die Mobilisation und Umverteilung von Cholesterin bei Wachstums-, Erhaltungs- und Reparaturvorgängen von Myelin und neuronalen Membranen koordiniert, reguliert es im ZNS wesentlich den Cholesterintransport für das Membran-Remodelling bei der synaptischen Übertragung und der dendritischen Reorganisation (Poirier, 2003). Das ApoE spielt im Gehirn eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase. So induziert eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Cholesterin in Astrozyten die Synthese von ApoE, das nach Bindung an Cholesterin und Phospholipiden als HDL-like Komplex in den Extrazellulärraum sezerniert und von Rezeptoren der Ventrikel umgebenden Ependymalzellen erkannt wird. Partiiell kann so Cholesterin in die Zerebrospinalflüssigkeit ausgeschieden werden. Andererseits wird bei erhöhter extrazellulärer Konzentration das Cholesterin als ApoE-Lipoproteinkomplex internalisiert. ApoE ist ebenfalls Mediator des β -Amyloidtransportes. Die β -Amyloid Fragmente $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ und deren Aggregation zu $A\beta$ -Plaques sind ein charakteristisches Kennzeichen für die Alzheimer Demenz. Sezerniertes β -Amyloid ist vorwiegend an ApoE

gebunden. Ebenso erfolgt die Wiederaufnahme von β -Amyloid zum weiteren Abbau nach intrazellulär über ApoE. (Poirier, 2003). Das ApoE 4 Allel ist der Hauptrisikofaktor für die sporadische Form der late-onset Alzheimer Demenz (LOAD), die ca. 80-90% der Alzheimererkrankungen betrifft. Junge (31 ± 5 Jahre), klinisch gesunde Träger dieses Allels zeigten in der Positronenemissionstomographie (PET) eine Reduktion des Glucosemetabolismus. Klinisch gesunde Träger über 50 Jahre haben häufiger signifikante kognitive Einbußen und einen verminderten Glucosemetabolismus in der PET.

1.4 Alzheimer Demenz

1.4.1 Krankheitsbild und Pathophysiologie der Alzheimer Demenz

Die Inzidenz degenerativer und vaskulärer dementieller Erkrankungen steigt beinahe exponentiell ab dem 70. Lebensjahr. (Poirier, 2003) Die Alzheimer Demenz ist nach Herz-Kreislauf-, Tumor- und Schlaganfallerkrankungen die vierthäufigste Erkrankung in den Industrieländern (Locatelli et al., 2002). Circa 10% der Bevölkerung über 65 Jahre und 50% der über 85 jährigen haben Alzheimer Demenz (Shumaker et al., 2003). Angesichts der aktuellen demographischen Entwicklung ist diese Erkrankung also von hohem gesundheitspolitischen Interesse. Die von dem Psychiater Alois Alzheimer 1906 zuerst beschriebene und nach ihm benannte progressiv dementielle Erkrankung führt unter dem klinischen Bild zunehmender Gedächtnisstörungen, kognitiver Einbußen, Sprach- und Orientierungsstörungen, apraktischen Störungen, Halluzinationen, Verhaltensauffälligkeiten und reaktiver Depressionen innerhalb von 8-10 Jahren (Schwankungsbreite 1-25 Jahre) nach Diagnosestellung zu Pflegebedürftigkeit und Tod (Rohkamm, 2000). Makroskopisch findet man eine diffuse Hirnatrophie. Frühbetroffene Areale sind der Hippokampus, temporaler Kortex und Nucleus basalis. Frühe metabolische Störungen zeigen sich im Positronenemissionstomogramm oder Single-Protonen-Emissions-Computer-Tomogramm (SPECT) im parietotemporalen Kortex, Nucleus basalis und Nucleus caeruleus.

Pathophysiologische Charakteristika sind extrazelluläre Plaques, die vorwiegend aus abgelagertem β -Amyloid ($A\beta$) bestehen und zuerst im Hippocampus, zerebellären Kortex, primärer und sekundärer Sehrinde und Nucleus basalis abgelagert werden, sowie intrazelluläre filamentöse Netze paarweise angeordneter helikaler Strukturen, die aus Neurofilamenten und hyperphosphoryliertem Tau-Protein zusammengesetzt sind (Buddecke, 2002). Das Amyloid Precursor Protein (APP) ist ein Membranprotein das durch Proteolyse von den α -, β -, und γ -Sekretasen unter Mitwirkung von Präsenilin1 und ApoE in verschieden

lange Fragmente gespalten wird. Physiologischerweise sind diese Peptide in geringer Konzentration als lösliche Monomere im Blut und Liquor nachweisbar. Bei der Alzheimer Demenz bilden sich aus A β ₄₂, Präsenilin und ApoE unlösliche fibrilläre Plaques, in deren Zentrum sich Cholesterin befindet (Poirier, 2003). Cholesterin beeinflusst die Prozessierung von APP. Niedrige Konzentrationen stimulieren die α -Sekretase und damit Proteolyse des APP zur löslichen Form des A β , hohe Cholesterinkonzentrationen fördern durch Inhibition der α -Sekretase die Entstehung der A β ₄₀₋₄₂-Aggregate. (Lütjohann et al., 2002). Präsenilin fungiert als Rezeptor des axonalen Transportes von APP. Das Apo E4 ist mit einem erhöhten Risiko für die Alzheimer Demenz und mit einem erhöhten Cholesterinspiegel assoziiert. (Lütjohann et al., 2002). Das Tau-Protein ist normalerweise löslich und fördert durch Bindung an Mikrotubuli deren geordnete Zusammenlagerung. Bei der Alzheimer Demenz entsteht durch Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins mit Anlagerung von Neurofilamenten ein unlösliches Netzwerk in Gestalt von paarig angeordneten helikalen Filamenten. Störungen des axonalen Transportes durch intra- und extrazelluläres A β und Destabilisierung des mikrotubulären Netzwerkes scheinen hauptsächlich verantwortlich für neuronale Degeneration und Verlust an Synapsen, die der Alzheimer Demenz zu Grunde liegen. Vier genetische Mutanten mit autosomal dominantem Erbgang, die an der Pathogenese der Alzheimer Demenz beteiligt sein können, sind bekannt: Wichtigster Risikofaktor ist das Apo E4 Allel (Chromosom 19), das die späte, nach dem 65. Lebensjahr auftretende Form, die sogenannte late-onset Alzheimer Demenz begünstigt. Diese sporadische Form betrifft 80-90% der Erkrankten. (Poirier, 2003) Träger des Apo E4 Allels haben eine 2-5fach erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit. Mutationen am APP (Chromosom 21), Präsenilin 2 (Chromosom 14) und Präsenilin 1 (Chromosom 1) sind jeweils mit einer vermehrten Bildung von A β ₄₂ verbunden und begünstigen das Auftreten einer frühen Alzheimer Demenz (early-onset Alzheimer Demenz, EOAD).

1.4.2 Alzheimer Demenz und Cholesterinstoffwechsel

Epidemiologische und neuropathologische Studien geben Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Alzheimer Demenz und Risikofaktoren bzw. Manifestationen vaskulärer Erkrankungen wie Hypertonie, Diabetes mellitus, ApoE4, generalisierte Atherosklerose, Myokardinfarkt oder ischämische Marklagerläsionen (Luchsinger et al., 2002; Skoog, 2000). In prospektiven Populationsstudien begünstigten Hypertonie bzw. Hypertonie und Hypercholesterinämie die Entstehung einer Alzheimer Demenz (Kivipelto et al., 2001; Launer

et al., 2000; Skoog et al., 1996), während andere lediglich einen Zusammenhang zwischen erhöhtem LDL-Cholesterin und vaskulärer Demenz, nicht aber zur Alzheimer Demenz (Moroney et al., 1999), oder aber keinen (Yoshitake et al., 1995; Zimetbaum et al., 1992) bzw. einen negativen Zusammenhang zwischen erhöhtem Lipoproteinspiegel und Demenz fanden (Swan et al., 1992). In einer Beobachtungsstudie an 1037 postmenopausalen Frauen mit koronarer Herzkrankheit (KHK) hatten diejenigen mit den höchsten Gesamt- und LDL-Cholesterinspiegeln eine erhöhte Wahrscheinlichkeit kognitiver Einbußen. Eine Senkung der Cholesterinspiegel über 4 Jahre war assoziiert mit einer 50%-igen Risikoreduktion für kognitive Einbußen (Yaffe et al., 2002). Diese Befunde könnten einerseits auf eine unzureichende diagnostische Trennschärfe zwischen vaskulärer und Alzheimer Demenz deuten oder klinisch stumme zerebrovaskuläre Läsionen könnten an der Pathogenese einer Alzheimer Demenz beteiligt sein. Andererseits könnten auch beiden Demenzformen gemeinsame pathogenetische Faktoren wie Veränderungen des Lipidmetabolismus zu Grunde liegen.

Hemmer der Cholesterinbiosynthese, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die so genannten Statine, senkten in Beobachtungsstudien signifikant die Inzidenz von Alzheimer Demenz, bzw. Demenz allgemein (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000), während fünf kleinere Studien, die allerdings nur wenige Wochen bis 6 Monate dauerten und zumeist jüngere Frauen einschlossen, keine Änderung der kognitiven Fähigkeiten unter Statinen zeigten (Gengo et al., 1995; Harrison und Ashton, 1994; Kostis et al., 1994; Muldoon et al., 2000; Roth et al., 1992). Eine neuerliche, prospektive Untersuchung an über 65-jährigen (n=5092) zeigte keine Assoziation zwischen Statineinnahme und dem Auftreten dementieller Erkrankungen (Zandi et al., 2005).

Tierexperimentell führte eine cholesterinreiche Ernährung zum Anstieg der intrazellulären β -Amyloid Immunreaktivität im Hippocampus (Sparks et al., 1994). Unter cholesterinreichem Futter wurde bei für das menschliche APP-transgenen Mäusen eine beschleunigte Amyloidablagerung im Gehirn beobachtet (Refolo et al., 2000). Der weitaus größte Anteil des Cholesterins im ZNS liegt in seiner freien Form vor, nur Spuren in seiner veresterten Form. Neuere Studien zeigten, dass nicht die Gesamtcholesterinkonzentration die Aktivität der α -Sekretase reguliert, sondern die Ratio freies Cholesterin/verestertem Cholesterin, wobei ein höherer Anteil an verestertem Cholesterin zu vermehrter Produktion von β -Amyloid führt. Inhibition der Cholesterinveresterung über die Acetyl-Coenzym A-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) führt zu Reduktion von β -Amyloid (Puglielli et al., 2001).

1.5 Steroidale Sexualhormone

1.5.1 Biosynthese und Abbau der Sexualhormone

Androgene, Östrogene und Progesterone sind die wichtigsten Sexualhormone. Ihnen gemeinsam ist, dass sie unter dem Einfluß des vorwiegend im Hypothalamus sezernierten Dekapeptides Luteinisierendes Hormon- Releasinghormon (LH-RH) und der nach LH-RH Stimulation im Hypophysenvorderlappen gebildeten Glykoproteindimere, FSH (Follikel stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) in den Sertolizellen des Hodens, den Granulosa- und Thekazellen des Ovars und in geringerer Menge auch in den Nebennierenrinden aus Cholesterin synthetisiert werden. Dabei sind die Androgene Prohormone der Östrogene. In den Steroidhormon-produzierenden Zellen wird Cholesterin zunächst in Pregnenolon umgewandelt (Abb. 4).

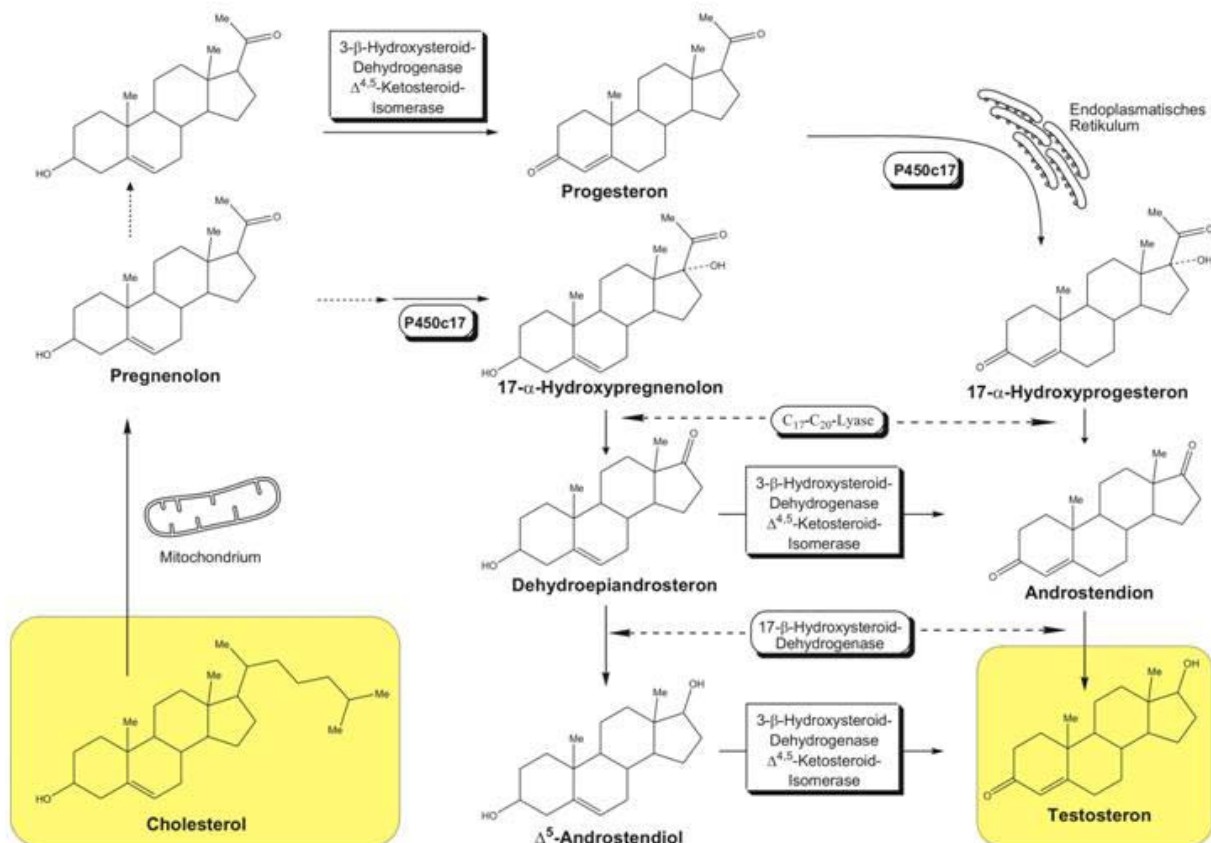


Abb. 4 Biosynthese des Testosterons aus Pregnenolon über den Δ^5 - oder den Δ^4 - Stoffwechselweg (modifiziert nach (Petrides, 2003))

Die Biosynthese der Androgene läuft dabei über zwei Wege ab. Im Δ^5 - Biosyntheseweg wird aus Pregnenolon über 17 α -Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron das Δ^5 -

Androstendiol gebildet. Im Δ^4 -Biosyntheseweg wird aus Pregnenolon über Progesteron, 17- α -Hydroxyprogesteron, und Androstendion das Testosteron synthetisiert.

Im Ovar stehen die Enzyme des Δ^5 - Stoffwechselweges nur in sehr geringen Konzentrationen zur Verfügung, so dass der Hauptsyntheseweg hier über Progesteron zu den Prohormonen Androstendion und Testosteron führt (Abb. 5). Für die Synthese der Östrogene ist die Kooperation der Granulosa- und Theka interna- Zellen erforderlich. Der Aromatase- Enzym-Komplex ist für die Umwandlung der Androgene (Androstendion bzw. Testosteron) in Östrogene (Östron bzw. Östradiol) verantwortlich.

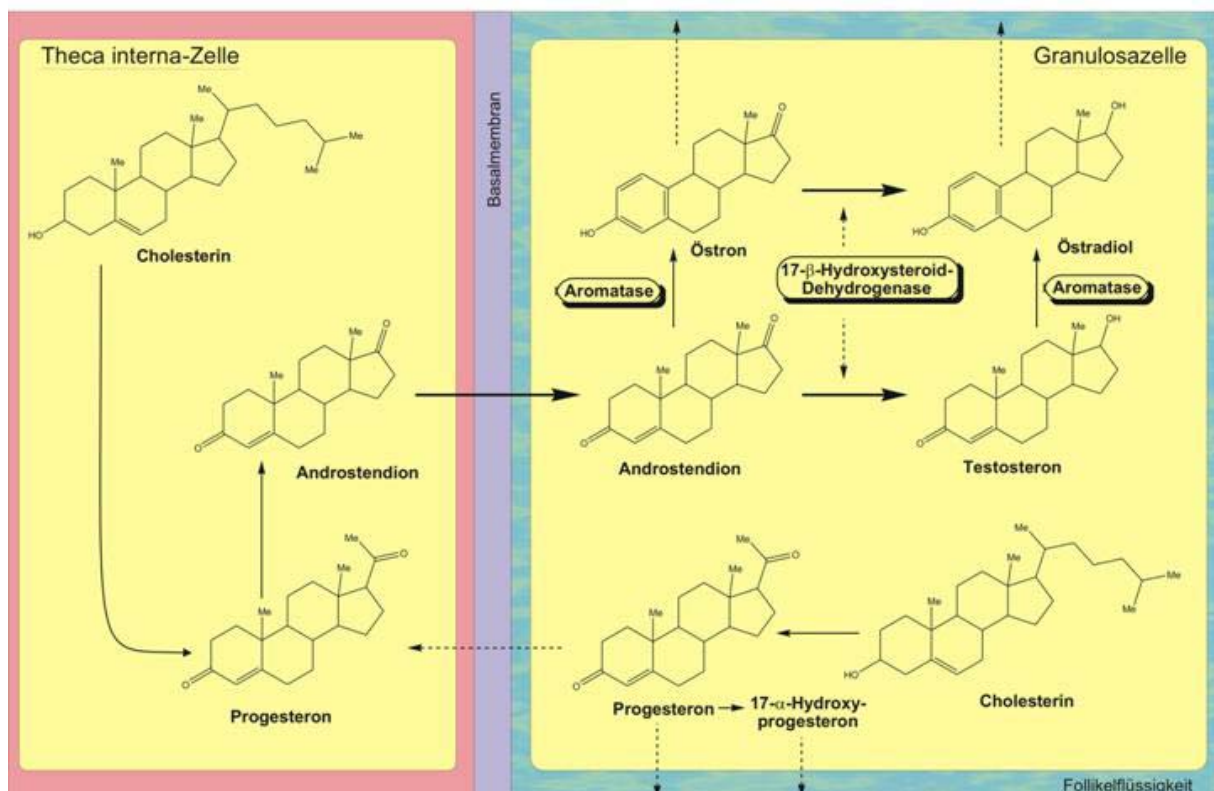


Abb. 5 Biosynthese der Östrogene und Progesterone (modifiziert nach (Petrides, 2003))

Neben den Leydig- und Sertolizellen der Hoden und den Granulosazellen des Ovars sind auch extragonadale Gewebe wie Fettgewebe, Muskel, Leber, Haarfollikel und Gehirn mit Aromatasen ausgestattet. Nach der Menopause, wenn das Ovar nur noch minimale Mengen an Östrogenen produziert, wird der Hauptanteil an Östrogenen über die Nebennierenrinde als Prohormon Androstendion, das dann extragonadal zu Östron aromatisiert wird, synthetisiert

(Petrides, 2003). Die Synthese der steroidalen Sexualhormone wird über ein komplexes Rückkopplungs-Regulationssystem gesteuert, wobei Östrogene, Progesterone und Testosterone im Hypothalamus über eine Änderung der Spiegel von endogenen Opiaten und Katecholaminen die Freisetzung von LH-RH modulieren. Östrogene und Progesteron können außerdem direkt an der Hypophyse eine positive Rückkopplung bewirken. Im Plasma werden die Androgene und Östrogene von dem Sexualhormon-bindenden Globulin (SHBG), in geringen Mengen auch von Albumin transportiert; Progesteron bindet an Transcortin, Cortisol-bindendes α -Globulin und ebenfalls an Albumin. Nur etwa 2% der Steroidhormone liegen in freier, biologisch aktiver Form vor (Kuhl und Taubert, 1987).

Der Abbau erfolgt über Hydroxylierung, Methoxylierung und anschließende Sulfatierung bzw. Glucuronidierung. Die Konjugate werden über Urin und Galle ausgeschieden, wobei ein erheblicher Anteil der enterohepatischen Zirkulation unterworfen ist (Petrides, 2003).

1.5.2 Östrogenrezeptoren und Östrogenwirkungen

Östrogene binden an spezifische Steroidrezeptoren. Man kennt zwei Östrogenrezeptoren: ER α und ER β . Letzterer agiert, zumindest bei niedrigen Östrogendosen, als Repressor gegenüber ER α (Hall und McDonnell, 1999). Der durch Östrogenbindung über eine Konformationsänderung aktivierte Hormon-Rezeptorkomplex bindet an Östrogenempfindliche Bindungsstellen (estrogen response element; ERE) der DNS und moduliert so die Transskription spezifischer Gene (Heringa, 2003). Dabei werden einzelne Reaktionen nach jeweils verschiedener Bindungszeit induziert. Die Dauer des Aufenthaltes des Östrogenrezeptor-Komplexes am Zellkern entscheidet daher über die Auslösung unterschiedlicher Östrogenwirkungen (Anderson et al., 1975). Unterschiedliche Wirkungen verschiedener Östrogene erklären sich so nicht nur durch Differenzen in der Bioverfügbarkeit und der Metabolisierung, sondern auch in der unterschiedlichen Rezeptoraffinität und damit Rezeptorbindungsdauer. Daneben gibt es auch nicht-genomische Wirkungen der Steroide. Beispielsweise können Östrogene den Kalziumeinstrom in die glatte Muskelzelle der Arterien blockieren. Auch können sie als Effektoren oder Inhibitoren die Aktivität von Enzymen modulieren. In den einzelnen Geweben werden die beiden Östrogenrezeptoren unterschiedlich exprimiert. Endometrium, Mamma-Tumorzellen und ovarielles Stroma enthalten vorwiegend ER α ; Granulosazellen, Spermatozoen, Nieren, Darmmucosa, Lungenparenchym, Knochenmark, Knochen, Gehirn, Endothelzellen und Prostata exprimieren vorwiegend ER β .

Östradiol kann zu Östradiolsulfat konjugiert oder zu Östron oxidiert werden und Östron kann zu Östronsulfat konjugiert werden. Diese Reaktionen sind reversibel und die Substanzen stehen in einem dynamischen Gleichgewicht. Die an Albumin bindenden Sulfate können so als Speicherformen der Östrogene bezeichnet werden.

Östrogene dominieren die erste Zyklushälfte. Sie induzieren Uteruswachstum und Proliferation der Uterusschleimhaut, Reifung des Vaginalepithels und des Zervixschleimes und sind verantwortlich für die Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale. Neben den Wirkungen als wichtigstes Sexualhormon haben die Östrogene entsprechend dem Nachweis von Östrogenrezeptoren in unterschiedlichen Geweben zahlreiche weitere Effekte. So verändern sie den Knochenstoffwechsel durch Verminderung der Osteoklastenaktivität, Aktivierung der Osteoblasten und fördern die Umwandlung des Vitamin D in die aktive Form des Vitamin D₃ (Petrides, 2003). Antiischämische Effekte der Östrogene zeigen sich in einer Verminderung des vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1 Spiegels, einer Wirkungsverstärkung des vasodilatatorisch wirkenden Mediators Stickoxid (NO) sowie in einer Hemmung des Kalziumeinstroms in die glatte Muskelzelle mit nachfolgender Gefäßrelaxation (Jiang et al., 1991; Polderman et al., 1993; White et al., 1995; Wilcox et al., 1997). Aufgrund ihrer phenolischen Struktur können Östrogene außerdem als Radikalfänger wirken und durch Elimination freier Sauerstoffradikale die Oxidation des LDL-Cholesterin und der Remnants reduzieren (Kuhl, 2001). Von besonderem Interesse im Hinblick auf kardiovaskuläre und zerebrovaskuläre Risiken sowie auf das Risiko dementieller Erkrankungen sind die Einflüsse auf Fettstoffwechsel, Endothel, antiatherogene Effekte, sowie mögliche neuroprotektive Effekte.

1.5.3 Konjugierte equine Östrogene

Die in unserer Untersuchung verwendeten konjugierten Östrogene (CEE conjugated equine estrogens) stellen eine Mischung neun verschiedener strukturell verwandter aus dem Urin trächtiger Stuten gewonnener Östrogensulfate dar (Abb. 6). Die equinen Östrogene beeinflussen dabei den hepatischen Stoffwechsel stärker als Östradiol (Lobo et al., 1988). Ihre Pharmakokinetik ist sehr komplex. Die einzelnen Komponenten können zum Teil ineinander umgewandelt werden oder sulfatidiert mit deutlich verlängerter Halbwertszeit als inerte Prohormone gebunden an Albumin zirkulieren. Noch drei Monate nach Absetzen von CEE fand man erhebliche Mengen Equilin im Serum (Whittaker et al., 1980).

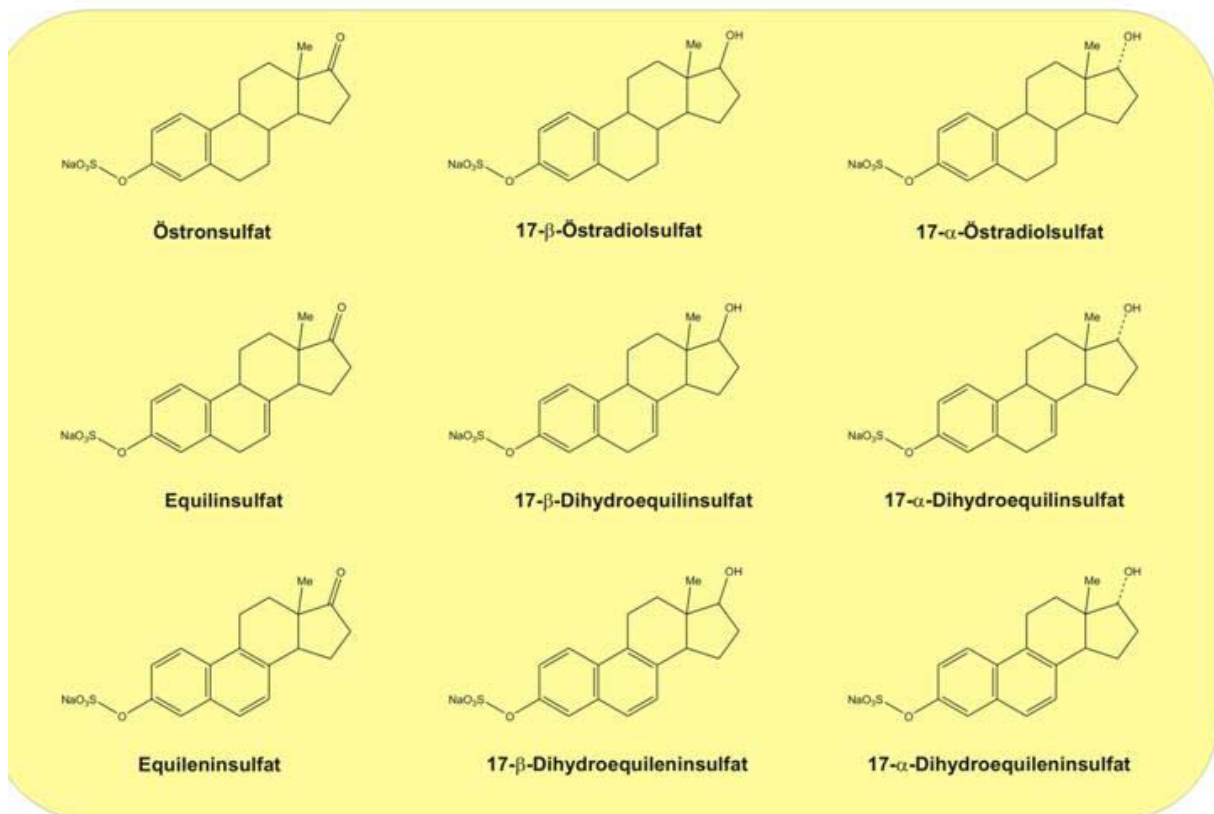


Abb. 6 Strukturformeln der in den konjugierten Östrogenen enthaltenen Östrogensulfate (Natriumsalze) (Kuhl und Taubert, 1987)

1.5.4 Progesteron und Medroxyprogesteronacetat

Progesteron bindet an den Progesteronrezeptor B (PRB), der nach dieser Aktivierung und Bindung an die DNS die Transkription spezifischer Gene moduliert; der zweite Progesteronrezeptor A (PRA) reprimiert PRB (Hall und McDonnell, 1999). In vieler Hinsicht wirkt das Progesteron antagonistisch zu den Östrogenen. Progesteron dominiert in der zweiten Zyklushälfte. Es fördert das Uteruswachstum und die Differenzierung des Endometriums zum Sekretionsstadium sowie die Ausbildung eines sekretionsfähigen Milchgangsystemes in der Schwangerschaft. Außerdem wirkt es thermogen auf das Temperaturzentrum des Gehirns und fördert die Natriumretention und den Proteinkatabolismus; einige Metabolite haben auch sedierende Wirkung. Im Fettstoffwechsel vermindert Progesteron die Triglyzeridsynthese, den Gehalt an HDL-Cholesterin und Lipoprotein(a) und erhöht die LDL-Cholesterinkonzentration und wirkt somit atherogen; in der Gefäßwand wirkt es konstriktorisch, indem es die östrogeninduzierte Stickoxid- (NO-) Freisetzung vermindert und

Endothelin I und Noradrenalin erhöht, und bewirkt eine Abnahme der Arterienwandelastizität (Petrides, 2003). Progesteron bzw. sein Hauptmetabolit $17\alpha, 20\alpha$ -Dihydroxyprogesteron wird glucuronidiert oder sulfatidiert über Galle und Urin ausgeschieden. Da das natürliche Progesteron sehr schnell metabolisiert wird, verwendet man zur Hormonsubstitution meist synthetische Präparate, deren Inaktivierung verzögert ist. Unterschiede in Bioverfügbarkeit, Proteinbindung an SHBG bzw. Albumin, Metabolismus und auch in jeweiliger Affinität zu den Androgen-, Glucocorticoid- und Mineralokorticoidrezeptoren resultieren in unterschiedlichen Wirkspektren und Wirkstärken. Das in dieser Untersuchung verwendete Medroxyprogesteronacetat (MPA, Abb. 7) hat eine Bioverfügbarkeit von nahezu 100%. Neben seiner antiöstrogenen hat es schwach androgene und glucocorticoide Wirkungen (Kuhl, 2001).

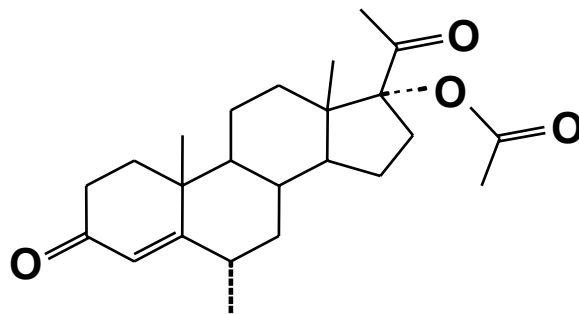


Abb. 7 Strukturformel von Medroxyprogesteronacetat

1.6 Hormonersatztherapie und Fettstoffwechsel – vaskuläres Risiko

Postmenopausale Frauen erkranken im Vergleich zu Männern doppelt so häufig an der Alzheimer Demenz (Shumaker et al., 2003) und auch das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen steigt postmenopausal vor allem nach bilateraler Ovariectomie in Abhängigkeit von der Dauer des Östrogenmangels deutlich an. Frauen zwischen 45 und 64 sind zu 14%, Frauen über 65 bereits zu mehr als einem Drittel von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen (Colditz et al., 1987; Kannel und Wilson, 1995; Kuhl, 1998; Parrish et al., 1967; Witteman et al., 1989). Die Menopause tritt durchschnittlich mit 51 Jahren ein; dank der in den industrialisierten Ländern mittlerweile auf 83 Jahre angestiegenen Lebenserwartung verbringen Frauen mehr als ein Drittel ihrer Lebensspanne postmenopausal (Sherwin, 2003). Daher sind die durch den postmenopausalen Östrogenmangel verursachten Veränderungen der kardiovaskulären Risikofaktoren und hier insbesondere Veränderungen im Cholesterinstoffwechsel bzw. deren Modulation durch Hormonersatztherapie von besonderem

Interesse. Postmenopausal wird das Lipidprofil mit Erhöhung der Triglyzeride, des Gesamt- und LDL- Cholesterins sowie des Lp(a) und Abnahme des HDL- Cholesterins in Richtung erhöhter Atherogenität verschoben.

Hormonersatztherapie (HRT; hormone replacement therapy) wurde ursprünglich eingesetzt, um klimakterische Symptome wie Hitzewallungen und genitale Atrophie zu reduzieren. Fall-Kontroll- und Kohorten-Studien ließen eine protektive Wirkung der HRT vor kardiovaskulären Erkrankungen vermuten (Crosignani et al., 1997; Rosenberg et al., 1993).

Metaanalysen zeigten eine bis zu 50%ige Reduktion des kardiovaskulären Risikos (Barrett-Connor und Grady, 1998; Grady et al., 1992; Stampfer und Colditz, 1991). In einer prospektiven Kohorten Studie mit über 70.000 postmenopausalen Frauen über 20 Jahre ergab sich unter konjugierten Östrogenen dosisabhängig eine Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse auf 0.54 bzw. 0.58, während unter höher dosierten >0.625mg konjugierten Östrogenen bzw. kombinierter Östrogen/Progestintherapie das Risiko für zerebrale Insulte anstieg (Grodstein et al., 2000b). In einer Fall-Kontroll-Studie entwickelten sich unter Hormonersatztherapie weniger arteriosklerotische Plaques in den großen Arterien (Griewing et al., 1999). Bei ovariectomierten Rhesusaffen verhinderte die Anwendung von HRT die bei unbehandelten Tieren auftretende Atherosklerose (Adams et al., 1990). Weitere Studien zeigten, koronarangiographisch kontrolliert, unter Östrogentherapie eine Regression der Koronarstenose (Gruchow et al., 1988; McFarland et al., 1989; Sullivan et al., 1990; Sullivan et al., 1988).

Östrogene beeinflussen den Fettstoffwechsel in erster Linie über ihre hepatische Wirkung. Durch Induktion der hepatischen LDL- und Remnant-Rezeptoren wird die Elimination dieser atherogenen Lipoproteine in der Leber verstärkt, so dass der Serumspiegel des LDL-Cholesterins abfällt. Gleichzeitig kommt es auf Grund einer gesteigerten Neusynthese in der Leber zur Erhöhung des HDL-Cholesterins und der Triglyzeride (Kuhl, 2001). Gestagene, insbesondere die mit androgener Partialwirkung, wirken hier antagonistisch. Sie schwächen den östrogeninduzierten Anstieg des HDL ab, begrenzen dagegen die Synthese der Triglyzeride (Kuhl, 2001). Entgegen den bis dahin vielversprechenden Arbeiten zur protektiven Wirkung der HRT vor kardiovaskulären Erkrankungen und trotz der günstigen Veränderungen des Lipidprofils erwiesen die neueren prospektiven Endpunktstudien kein Benefit (Grady et al., 2002; Herrington et al., 2000; Rossouw et al., 2002; Vogelvang et al., 2005).

1.7 Hormonersatztherapie - Kognition und Demenz

Die geschlechtsspezifische Inzidenz verschiedener neuropsychiatrischer Erkrankungen sowie die unterschiedliche Krankheitsausprägung im Zyklusverlauf bzw. nach der Menopause lassen einen Einfluss der Sexualhormone vermuten. Für das wichtigste weibliche Sexualhormon Östradiol wurden neben den bekannten Wirkungen auf die primären und sekundären Geschlechtsmerkmale auch zahlreiche Einflüsse auf das Zentralnervensystem nachgewiesen. So hat es einen wichtigen Anteil schon an der Entwicklung insbesondere des männlichen Gehirnes (Kölsch und Rao, 2002), beeinflusst Zahl und Größe von Neuronen, stimuliert die Bildung synaptischer Verbindungen, das Neuritenwachstum und die Vernetzung bestimmter Kerne, moduliert die Expression von Apolipoprotein E, reduziert die Bildung von β -Amyloid, verbessert die zerebrale Durchblutung und erhöht den regionalen Glukosemetabolismus. Östrogene, Gestagene und Androgene modulieren, zum Teil antagonistisch, die Bildung, Freisetzung, Wiederaufnahme und Inaktivierung verschiedener Neurotransmitter (Kuhl, 2001; Resnick und Henderson, 2002; Shumaker, et al., 2003).

Unter der Vermutung einer hormonellen Beeinflussung neuropsychiatrischer Erkrankungen stellt sich auch die Frage nach über die zuvor beschriebenen antiatherogenen und antiischämischen Effekte der Östrogene hinausgehenden direkten neuroprotektiven Effekten, insbesondere im Hinblick auf die Alzheimer Demenz. Nach der Menopause sinken die Östrogenspiegel erheblich ab. Postmenopausale Frauen haben häufiger als gleichaltrige Männer Alzheimer Demenz. (Shumaker et al., 2003) Da auch die neurobiologischen Befunde einen Zusammenhang zwischen Östrogenspiegeln und Demenz plausibel erscheinen lassen, wurde vermutet, dass der postmenopausale Östrogenabfall das Risiko auch für die Alzheimer Demenz erhöht.

In einigen Studien, die nach dem Zusammenhang zwischen endogenen Östradiolspiegeln und kognitiven Fähigkeiten bzw. Demenz fragten, waren niedrigere Östrogenspiegel assoziiert mit schlechteren kognitiven Fähigkeiten und vermehrten Verhaltensstörungen sowie erhöhter Wahrscheinlichkeit von Alzheimer Demenz. In Longitudinalstudien an über 65 Jährigen und einem Untersuchungszeitraum von 2,5 bis 6 Jahren hatten Frauen mit HRT bessere Testergebnisse für kognitive Fähigkeiten wie Gedächtnis, Sprache, abstraktes Denken und Redefluss sowie auch in Globaltesten wie dem modifizierten mini mental state examination (MMSE) und dem cognitive abilities screening instrument (CASI) und zeigten im untersuchten Zeitraum signifikant weniger Verlust kognitiver Fähigkeiten (Grodstein et al., 2000a; Jacobs et al., 1998; Matthews et al., 1999; Resnick et al., 1997; Rice et al., 2000; Steffens et al., 1999; Yaffe et al., 2000a; Yaffe et al., 2000b; Honjo et al., 1989; Senanarong et

al., 2002). In einer ersten bereits 1952 durchgeführten randomisierten kontrollierten Untersuchung zeigten Frauen unter Östradiol nach einem Jahr einen höheren verbalen, nicht aber visuellen oder räumlichen IQ solange die Behandlung andauerte. (Caldwell und Watson, 1952) Die Ergebnisse weiterer, sogenannter recall cognitive trials (RCT), sprechen insgesamt für eine Verbesserung von verbalem Gedächtnis und Lernen unter höheren Östrogenspiegeln. (Binder et al., 2001; Campbell und Whitehead, 1977; Ditkoff et al., 1991; Duka et al., 2000; Fedor-Freybergh, 1977; Hackman und Galbraith, 1976; Janowsky et al., 2000; Miller et al., 2002; Phillips und Sherwin, 1992; Polo-Kantola et al., 1998; Rauramo et al., 1975; Sherwin, 1988; Sherwin, 2003; Wolf et al., 1999).

Fall-Kontrollstudien zum Zusammenhang von HRT und dem Risiko einer Demenzerkrankung erbrachten inkonsistente Ergebnisse (Broe et al., 1990; Henderson et al., 1994; Mortel und Meyer, 1995; Paganini-Hill und Henderson, 1994). Zwei prospektive Kohortenstudien, die Baltimore Longitudinalstudie mit 472 Frauen über 16 Jahre Dauer bzw. mit 1124 Frauen über 1- 5 Jahre zeigten eine 50%ige Risikoreduktion. (Kawas et al., 1997; Tang et al., 1996). Eine Metaanalyse über (Amaducci et al., 1986; Brenner et al., 1994; Broe et al., 1990; Graves et al., 1990; Henderson et al., 1994; Heyman et al., 1984; Kawas et al., 1997; Mortel und Meyer, 1995; Paganini-Hill und Henderson, 1994; Tang et al., 1996) zeigte eine 29%ige Risikoreduktion für die Alzheimer Demenz (Yaffe et al., 1998). In einer prospektiven Kohortenstudie an 1357 Männern und 1889 Frauen (Zandi et al., 2002) hatten Frauen eine doppelt so hohe Inzidenz der Alzheimer Demenz wie Männer; Hormonersatztherapie verringerte das Risiko abhängig von der Dauer der Therapie, so dass bei über 10 jähriger HRT das geschlechtsspezifisch erhöhte Risiko der Frauen dem der Männer angeglichen war. Insbesondere frühere HRT war Risiko reduzierend, aktuelle Therapie nur dann, wenn sie über 10 Jahre bestand. Diese Befunde sprechen für ein therapeutisches Fenster nach der Menopause, bzw. dafür, dass HRT als potentiell neuroprotektives Agens innerhalb der 10 jährigen Latenzphase vor der Erkrankung an Effekt verliert. Damit übereinstimmend konnten, obwohl kleine meist unkontrollierte Therapiestudien in einzelnen Testbereichen Verbesserungen unter HRT gesehen hatten (Fillit et al., 1986; Honjo et al., 1989; Ohkura et al., 1994), in neueren größeren kontrollierten Therapiestudien bei leichter bis moderater Alzheimer Demenz keine positiven Effekte von Östrogenen auf kognitive Fähigkeiten nachgewiesen werden (Henderson et al., 2000; Mulnard et al., 2000; Wang et al., 2000).

1.8 Raloxifen

Hormonersatztherapie bzw. Östrogene werden zur Prävention und Therapie der Osteoporose eingesetzt. Ein Risiko der Langzeitöstrogentherapie ist die erhöhte Inzidenz von Brustkrebs

(Cancer, 1997). Dies führte zur Entwicklung der selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM). Tamoxifen und Raloxifen, abstammend von dem potenten Östrogen Diethylstilbestrol, gehören nicht zur Gruppe der Steroide, sind miteinander nicht strukturverwandt und wirken als kompetitive Agonisten /Antagonisten am Östrogenrezeptor (Abb. 8). Wegen seiner antiöstrogenen Effekte auf die Brustdrüse wird Tamoxifen zur Therapie des Brustkrebses eingesetzt; nachteilig sind allerdings Endometriumhyperplasie und ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome sowie nur teilreversible Augenschädigungen (Birge, 2000; Fisher et al., 1998). Raloxifen, ein SERM der zweiten Generation, zeigte eine ebenfalls deutliche Risikoreduktion für das Mammakarzinom, insbesondere für die Östrogen Rezeptor positive Form, ohne jedoch die Zahl der Endometriumkarzinome zu erhöhen (Cauley et al., 2001; Cummings et al., 1999; Jordan et al., 1998).

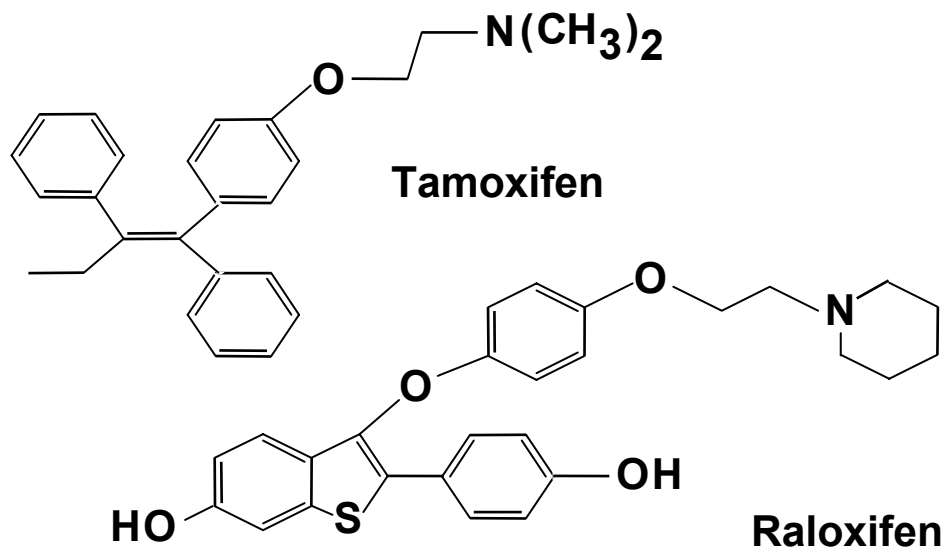


Abb. 8 Strukturformeln von Tamoxifen und Raloxifen

Es wurden Studien zur Aufklärung der Wirkmechanismen und der im Vergleich zu den Östrogenen günstigen bzw. nachteiligen Effekte auf verschiedene Gewebe durchgeführt. Das in unserer Studie verwendete Raloxifen interagiert mit dem Östrogenrezeptor. Der Östrogenrezeptor befindet sich im Zellkern. Es ist ein hormonaktivierter Transskriptionsfaktor, der die Transskription bestimmter Gene supprimieren oder stimulieren kann. Es gibt zwei Subtypen, die Östrogenrezeptoren α und β , die eine gewebsspezifische Verteilung aufweisen. Östrogen und Raloxifen induzieren dabei jeweils unterschiedliche Konformationsänderungen des Östrogenrezeptors. Der resultierende Hormon-Rezeptor-

Komplex bindet wiederum an drei verschiedenen DNS-Bindungsstellen, dem so genannten Östrogen response element, am activator protein 1 (AP1) oder am Raloxifen response element (RRE), wo Raloxifen je nach DNS- Bindungsstelle bzw. Rezeptorsubtyp entweder als Östrogenagonist, partieller Agonist, oder Östrogenantagonist wirkt (Heringa, 2003).

Raloxifen wird zu 60% resorbiert, seine Bioverfügbarkeit liegt auf Grund eines hohen first-pass Effektes nur bei 2%. Es ist zu 95% an Plasmaeiweiß zumeist an Albumin gebunden. In der Leber wird der größte Teil des Raloxifens mit Glucuronsäure konjugiert; die Metaboliten sind weniger aktiv als Raloxifen selbst. Nur 0.2% wird unverändert und weniger als 6% als Glucuronsäurekonjugat im Urin ausgeschieden; der größte Teil wird via Fäzes eliminiert, wobei durch den enterohepatischen Kreislauf die Halbwertszeit auf ca. 27 Stunden verlängert wird. Eine Akkumulation bei hepatischer Insuffizienz geht dem Bilirubinwert parallel. Neben den oben beschriebenen Effekten auf Brustdrüse und Endometrium wurden unter 60mg Raloxifen eine Zunahme der Knochendichte und Abnahme von Wirbelfrakturen, nicht jedoch anderer Frakturen und Abnahme des Serumpyridinolin, einem Marker der Knochenresorption gefunden (Ettinger et al., 1999; Hernandez et al., 2003).

Auch Veränderungen von Markern kardiovaskulärer Risiken wurden untersucht. Unter 60mg Raloxifen über 1 Jahr wurde das LDL-C bei gleich bleibendem HDL-C, Gesamtcholesterin und Triglyceriden gesenkt (Hernandez et al., 2003). Nach drei- bis sechsmonatiger Gabe von 60mg bzw. 120mg Raloxifen in einer doppelblinden Studie an 360 postmenopausalen Frauen kam es ebenso zu einer Senkung des LDL-C bei gleich bleibenden HDL-C und Triglyceriden, außerdem einer Erhöhung des HDL2-C und einer Erniedrigung des Lp(a), eines weiteren kardiovaskulären Risikofaktors, der nach der Menopause ansteigt (Walsh et al., 1998).

Da einerseits für Östrogene eine protektive Wirkung für kognitive Funktionen angenommen wird und andererseits auch ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit gesehen wird, ist auch die Wirkung von Raloxifen auf das ZNS von Interesse. Allerdings wurden die Effekte von Raloxifen und anderen SERMs auf das Zentrale Nervensystem und seine Funktionen wie Kognition bislang nicht gut untersucht. Nach sechsmonatiger Raloxifengabe wurde bei älteren Männern das FSH gesenkt (Doran et al., 2001), bei postmenopausalen Frauen stieg das β - Endorphin (Neele et al., 2002). Bei einer kleinen Gruppe von Frauen veränderten sich in der Magnet-Resonanztomographie (MRT) nur bei visueller Stimulation die Aktivierungsmuster (Neele et al., 2001). In einer plazebokontrollierten Studie an Frauen mit Alzheimer Demenz schien unter 120mg Raloxifen das verbale Gedächtnis tendentiell verbessert. (Cholerton et al., 2002). In einer Plazebo-kontrollierten Studie bei 143 postmenopausalen Frauen beeinflusste die

einjährige Raloxifengabe weder Kognition noch Stimmung (Nickelsen et al., 1999). In der MORE Studie, in der 7478 postmenopausale Frauen über 3 Jahre 60mg oder 120mg Raloxifen bzw. Plazebo erhielten, wurde ebenfalls kein Effekt auf kognitive Funktionen gefunden (Yaffe et al., 2001).

1.9 Fragestellung

Ein der Alzheimer Demenz und vaskulären Erkrankungen gemeinsam zugrunde liegender Pathomechanismus könnte in Veränderungen des Cholesterinmetabolismus bestehen. Variation des Lipidprofils ist ein wichtiger Risikofaktor vaskulärer Erkrankungen, die genetische Variante des Cholesterintransporters ApoE4 Hauptrisikofaktor für erhöhtes Cholesterin und Auftreten einer Alzheimer Demenz. Die beschriebenen Zusammenhänge von Östrogenspiegeln, Kognition und vaskulären Erkrankungen könnten ebenfalls durch Veränderungen des Lipidmetabolismus bedingt sein. Sowohl Östrogene als auch Raloxifen beeinflussen das Lipidprofil. Daher ist es Ziel dieser Untersuchung einen möglichen Einfluss von Raloxifen oder Hormonersatztherapie auf zirkulierendes Cholesterin, seine Vorstufen und seine Metabolite, insbesondere auf das gehirnspezifische Abbauprodukt 24S-Hydroxycholesterin nachzuweisen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studienteilnehmer

Per Anzeige in lokalen Zeitungen wurden gesunde, früh-postmenopausale, nicht-hysterektomierte, Frauen gesucht. 167 Frauen wurden für diese monozentrische 2-Jahres-Substudie gescreent, die als Teil einer großen Multi-Center-Studie in der Ambulanz der Abteilung für Gynäkologie, Geburtshilfe und Endokrinologie, Medizinisches Zentrum der Freien Universität Amsterdam, Niederlande durchgeführt wurde. Weitere Untersuchungen zu anderen Aspekten wie z.B. Änderungen der Knochenmineraldichte und Endometriumdicke wurden bei diesen Probanden außerdem durchgeführt und zum Teil bereits publiziert (Post et al., 2001; Smolders et al., 2002; Vogelvang et al., 2004; Vogelvang et al., 2002). In der hier beschriebenen Substudie haben wir Änderungen von Serummarkern der Cholesterinbiosynthese und seiner Abbauprodukte in Gehirn und Leber unter verschiedenen Dosierungen von Raloxifen und Hormonersatztherapie verfolgt. Diese Untersuchungen folgten den Prinzipien der Helsinki-Deklaration zur Durchführung von klinischen Studien am Menschen unter ethischen Gesichtspunkten. Alle Teilnehmer unterschrieben vor Eintritt in die Studie eine **Einverständniserklärung**. Die lokale **Ethikkommission** der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Amsterdam gab ihr Positivvotum. Die Teilnehmerinnen waren zwischen 47 und 60 Jahre alt. Die letzte Menstruation war zwischen 6 und 24 Monaten vor Eintritt in die Studie, die FSH-Konzentration betrug über 30 IU/L und es bestanden bei keiner Teilnehmerin intolerable klimakterische Beschwerden. Der Body-Mass-Index lag zwischen 18 und 41.4 kg/m² und der Gesamtcholesteringehalt im Serum war unter 300 mg/dL (8 mmol/L). Eine Lipid senkende Therapie war ausgeschlossen. Die Probandinnen wurden gebeten, für die Dauer der Studie weder Ess- und Rauchgewohnheiten noch körperliche Aktivität zu ändern. Ausschlusskriterien waren kardiovaskuläre, thromboembolische und endokrinologische Erkrankungen in der Vorgeschichte, östrogenabhängige Neoplasien und erhöhter Konsum von Alkohol oder Drogen sowie auch relevante Abweichungen klinisch-chemischer Laborparameter von Leber- und Nierenfunktion. Ebenso wurden Frauen, die zuvor bereits an Studien mit Raloxifen teilgenommen hatten, ausgeschlossen. Tabelle 1 beschreibt die demographischen und klinischen Daten der Probandinnen.

	Plazebo	Rlx 60	Rlx 150	HRT	P-value ^a
N (Anzahl)	20	21	16	14	
Alter (Jahre)	51,6 ± 3,2	50,7 ± 2,9	51,2 ± 2,4	51,5 ± 2,0	0,710
Dauer der Amenorrhoe (Monate)	13,3 ± 5,2	13,1 ± 5,2	13,1 ± 4,9	12,2 ± 5,4	0,882
Body Mass Index (kg/m ²)	26,4 ± 4,4	23,9 ± 2,8	25,3 ± 3,7	25,0 ± 2,4	0,163
Blutdruck: systolisch (mm Hg)	127 ± 16	118 ± 14	126 ± 10	123 ± 13	0,192
diastolisch (mm Hg)	83 ± 8	79 ± 9	80 ± 6	80 ± 7	0,290
Raucher:	9 (45)	5 (24)	8 (50)	1 (8)	0,035
Serumcholesterin (enzym.) (mmol/L)	5,7 ± 0,9	6,1 ± 1,1	6,2 ± 0,7	6,1 ± 0,9	0,364
Serum FSH (IU/L)	88,3 ± 32,2	88,4 ± 29,5	92,5 ± 30,6	89,4 ± 25,0	0,973
Serum E ₂ (pmol/L)	7 [5-50]	8 [5-285]	18 [5-338]	21 [5-209]	0,428

Die Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung oder als Median [Spannweite] angegeben. Die Prozentwerte erscheinen in Klammern.

(Zur Umwandlung des Cholesteringehaltes von mmol/L in mg/dL: Division durch 0,0259)

^a Ein-Weg- ANOVA oder χ^2 -Test für Unterschiede zwischen den Gruppen.

Rlx 60 = Raloxifen 60 mg; Rlx 150 = Raloxifen 150 mg; HRT = 0,625 mg konjugierte equine Östrogene kombiniert mit 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat; FSH = Follikel stimulierendes Hormon; E₂ = 17 β -Östradiol.

Tabelle 1 Demographische Daten der Studienteilnehmerinnen und Verteilung auf die Gruppen bei Studienbeginn

2.2 Randomisierung und Studiendesign

Schliesslich wurden 95 in Frage kommende Frauen zufällig den unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Dies waren die Placebogruppe, eine zweite mit 60 mg Raloxifen (Rlx 60; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA), eine weitere Gruppe mit Raloxifen 150 mg (Rlx 150) und eine Gruppe mit Hormonersatztherapie 0,625 mg konjugierten equinen Östrogenen (CEE; Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA, USA) in Kombination mit 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat (MPA; The Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA). Die Randomisierung und die Studiendurchführung erfolgten im Doppelblindmodus, indem Medikamente und Placebo nach Zufallsnummern verpackt und den Teilnehmerinnen in Reihenfolge ausgehändigt wurden. Zwölf Frauen, deren Basiswerte nicht erfasst werden konnten (Placebo-Gruppe drei, Rlx 60-Gruppe zwei, Rlx 150-Gruppe vier und HRT-Gruppe drei Frauen), wurden ausgeschlossen. Weitere zwölf Frauen nahmen bereits an der 6-Monatsuntersuchung nicht mehr teil und wurden somit nicht mehr in die weiteren Analysen einbezogen (und zwar eine aus der Placebogruppe, eine aus der Rlx 60-Gruppe, drei aus der Rlx 150-Gruppe und sieben aus der HRT-Gruppe). Keine Teilnehmerin fiel auf Grund eines kardiovaskulären Ereignisses aus. Somit basierten die Analysen letztlich auf Messungen an 71 Frauen, von denen zumindest Basis-, 6- und 12-Monatsmesswerte vorlagen. Lediglich bei 2 Frauen (einer aus der Placebo- und einer aus der HRT-Gruppe) konnte nach 24 Monaten keine Blutprobe entnommen werden, so dass in den vier Gruppen eine Verteilung blieb, die in Tabelle 1 wiedergegeben ist. Für die Varianzanalysen wurden die fehlenden Werte mit den zuletzt gemessenen (12-Monatswerten) ergänzt. Bis auf die Anzahl der Raucherinnen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Obwohl die FSH-Werte bei allen Teilnehmerinnen über 30 IU/L lagen, wurden bei 5 Frauen Östrogenkonzentrationen über 200 pmol/l festgestellt; wahrscheinlich bedingt durch die erst kürzlich eingetretene, letztlich aber wenigstens 6 Monate dauernde Amenorrhoe. (Rlx 60-Gruppe: n=2; Rlx 150-Gruppe: n=2; HRT-Gruppe: n=1).

2.3 Probennahme und Probenasservierung

Venöse Blutabnahmen wurden unmittelbar vor Studienbeginn als Basismessung sowie im Studienverlauf nach 6, 12 und 24 Monaten durchgeführt. Dazu mussten die Probanden nüchtern sein und eine wenigstens 10-stündige Rauch- sowie 24-stündige Alkoholkarenz einhalten. Die Blutentnahmen erfolgten dann zwischen 8 und 10 Uhr morgens nach einer wenigstens 20-minütigen Ruhepause. Die Proben wurden innerhalb einer Stunde nach

Entnahme bei 3000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und nach Aufteilung in Aliquots (1 ml Eppendorfgefäße) in flüssigem Stickstoff schockgefroren bei -70°C bis zum Zeitpunkt der Analyse aufbewahrt. Da nach der Zentrifugation dem Serum kein Antioxidanz wie z. B. 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol (BHT) zugesetzt wurde, konnten wir nicht ausschließen, dass ein gewisser Anteil von Cholesterin bei der Probenasservierung und vor der Aufarbeitung bereits autoxidativ in 7 α -Hydroxycholesterin umgewandelt wurde. Daher verzichteten wir in unserer Untersuchung auf die Bestimmung dieser Gallensäurevorstufe.

2.4 Materialien

2.4.1 Instrumentelle Ausstattung

- Analytische Waage (Sartorius MC-5, Sartorius AG, Göttingen)
- Spatel
- Pipetten (50, 100 und 1000 μ L, Fa Eppendorf)
- Reagenzgläser mit Teflon-beschichteten Septen und Schraubverschluss (10 mL)
- Vortex-Mixer
- Temperaturregulierter Heizblock mit Stickstoff-Abdampfvorrichtung
- Glas-Phiolen (2 ml) mit Mikroeinsätzen (300 μ L) für den Autosampler
- Zentrifuge (Varifuge F oder 3.OR, Fa. Heräus)
- Glaspasteurpipetten
- Temperaturreguliertes Wasserbad
- DB-XLB 122-1232 vernetzte Silicon-Kapillarsäule (30 m x 0.25 Innendurchmesser x 0,25 μ m Schichtdicke, J&W, Folsom, USA)
- Hewlett Packard Gaschromatograph (HP 6890) mit FID
- HP 7683 Automatischer Probenaufgeber mit Probensteller
- 2 x Kayak XA Pentium II-Computer
- HP GC ChemStation Software (Version 2.1.1.0)
- Hewlett Packard Gaschromatograph (HP 5890 II) kombiniert mit HP 5971 Quadrupol massenselektivem Detektor (MSD)
- HP 7673 Automatischer Probenaufgeber mit Probensteller
- HP ChemStation Software G1034C ChemVersion C.02.00

2.4.2 Reagenzien

- 5 α -Cholestan (Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg)
- Cyclohexan (Merck KGaA, Darmstadt)
- n-Dekan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Pyridin (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Hexamethyldisilasan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Trimethylchlorosilan (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Aqua bidest.
- NaOH 1mol/L (90% Äthanol) (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Äthanol (Merck, KGaA, Darmstadt)
- 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluol (BHT) (Merck, KGaA, Darmstadt)
- MeOH (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Epicoprostanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Cholesterin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Cholestanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Campesterin/Sitosterin (40:60;w/w) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Lanosterin (Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg)
- Desmosterin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Lathosterin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- 24S-Hydroxycholesterin (Medical Isotopes, Inc. Pelham, H, USA)
- [23,23,24,25-²H₄]24R,S-Hydroxycholesterin (Klin. Chemie, Karolinska-Institut, Stockholm, Schweden)(Dzeletovic et al., 1995)
- 27-Hydroxycholesterin (Steraloids Inc., Newport, USA)
- [15,16,17,20,22-²H₅]27-Hydroxycholesterin (Klin. Chemie, Karolinska-Institut, Stockholm, Schweden)(Dzeletovic et al., 1995)

2.5 Probenaufarbeitung

Die Sterine in den Serumproben werden zur gaschromatographischen Trennung mit anschließender Flammenionisationsdetektion oder massenselektiver Detektion zunächst in ihre freie Form gebracht, indem durch eine alkalische Hydrolyse die fettsäureveresterten Sterine dekonjugiert werden. Danach werden die freien Sterine extrahiert und mittels eines Silylierungsreagenzes in einen Silylsterinäther umgewandelt.

- Die tiefgefrorenen Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut.
- 1 µg Epicoprostanol (10 µl einer Stammlösung von 100 µg/ml in Cyclohexan), 50 µg 5α-Cholestan (50 µl einer Stammlösung von 1 mg/ml in Cyclohexan) und jeweils 100 ng razemisches [23,23,24,25-²H₄]24R,S-Hydroxycholesterin und [15,16,17,20,22-²H₅]27-Hydroxycholesterin (100 µl einer Stammlösung eines Gemisches von [²H₄]24R,S-Hydroxycholesterin und [²H₅]27-Hydroxycholesterin, 1 µg/ml in MeOH) wurden als interne Standards zu 200 µl der Serumprobe bei Raumtemperatur in einem Teflon-beschichteten Reagenzglas mit Schraubverschluss zugesetzt.
- Zur Vermeidung von autoxidativen Prozessen wurden außerdem noch 50 ng 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) (10 µl aus einer Stammlösung von 50 mg BHT/10 ml MeOH) zugesetzt.
- Zur alkalischen Hydrolyse wurde das Probengemisch nach Zusatz von 1 ml 90%-iger äthanolischer NaOH-Lsg. (1M) im Wasserbad bei 68°C über 1 Stunde inkubiert.
- Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Zusatz von 500 µl aqua bidest. wurden die freien Sterine, Stanole und Oxysterine zweimal in 3 ml Cyclohexan extrahiert.
- Die vereinigten organischen Phasen wurden unter Stickstoffbegasung bei 65°C getrocknet.
- Die Hydroxylgruppen der Sterine und Stanole wurden nach Zugabe von 1 ml eines Trimethylsilylierungsreagenzes (Pyridin-Hexamethyldisilasan-Trimethylchlorsilan, 9:3:1; v/v/v) zum Rückstand nach 1-stündiger Inkubation bei 65°C zu Trimethylsilyläthern derivatisiert. Als Beispiele sind die Silylierungen von 24S- und 27-Hydroxycholesterin in Abb. 9 aufgeführt.
- Die restlichen Silylierungsreagenzien wurden daraufhin unter Stickstoffbegasung bei 65°C verdampft.
- Der Überstand wurde in 160 µl n-Dekan gelöst.
- 80 µl dieses Gemisches an Sterintrimethylsilyläthern in n-Dekan wurden in die Mikroinsätze der Glasphiolen für die GC-MSD-Analyse überführt.
- Die übrigen 80 µl wurden mit 500 µl n-Dekan für die GC-FID-Analyse verdünnt.
- Die Glasphiolen wurden zur eindeutigen Identifizierung beschriftet.

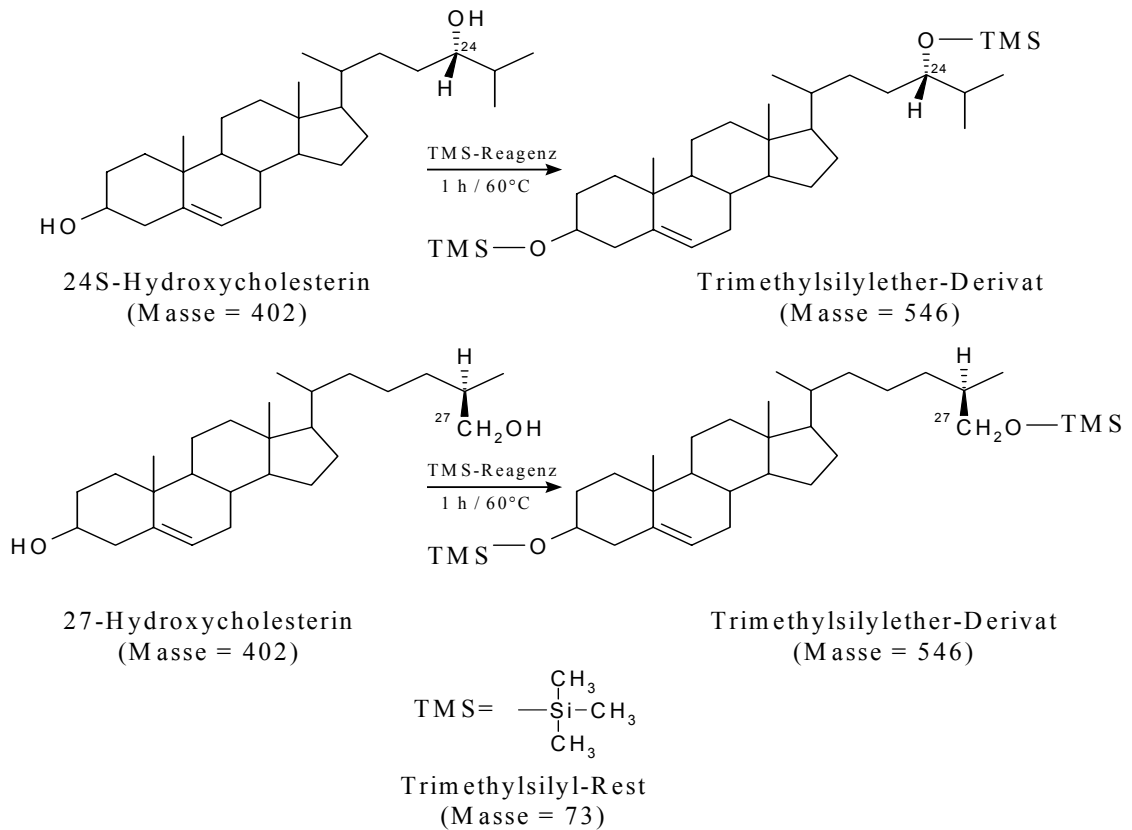


Abb. 9 Überführung der Oxysterine 24S- und 27-Hydroxycholesterin in ihre Trimethylsilyläther mittels Trimethylsilylierungsreagenz

2.6 Beschreibung der Analyseverfahren

Cholesterinvorstufen und -metabolite wie das 24S- und das 27-Hydroxycholesterin liegen im Serum in einer 10^3 bis 10^4 -fach geringeren Konzentration als ihre Ausgangssubstanz Cholesterin vor. Daher wird die Konzentration des Cholesterins in Serumproben durch die weniger spezifische und selektive Flammenionisationsdetektion bestimmt, während die Cholesterinvorstufen und -metabolite durch die hochspezifische massenselektive Detektion erfasst werden.

2.6.1 Gaschromatographie

Das zu untersuchende in n-Dekan gelöste Sterintrimethylsilyläthergemisch wird nach Überführung vom Probensteller mittels automatischem Probengeber im Injektor des Gaschromatographen in den Trägergasstrom, im Falle der Detektion mittels FID in

Wasserstoff und beim MSD in Helium, eingebracht. Zur Gaschromatographie eignen sich daher nur Stoffe, die bereits gasförmig vorliegen oder sich unzersetzt in die Gasphase überführen lassen. Schwerflüchtige Substanzen müssen durch geeignete Derivatisierungsreaktionen- für Sterine werden meistens Silylierungsreaktionen eingesetzt - in besser verdampfbare Verbindungen überführt werden (Rücker et al., 1992). Die Substanzen werden mit dem Trägergas auf eine Säule transportiert, die in einem Ofen über Temperaturprogramme (Gradienten) beheizt werden kann. Die Trennung der Substanzen in der Säule erfolgt durch ihr unterschiedliches Verteilungsverhalten zwischen flüssiger Phase und Trägergasstrom.

2.6.2 Flammenionisationsdetektion

Die getrennten Verbindungen eluieren mit unterschiedlichen Retentionszeiten von der Säule, gelangen im Falle des FID direkt in die Flamme und werden dort vollständig verbrannt. Es entsteht unter anderem ein CHO-Kationenstrom, dessen Intensität in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Je höher die Konzentration eines Stoffes ist, desto stärker ist das elektrische Signal. Mittels computergesteuerter Auswertung erscheint dieses Signal letztlich in Form eines Peaks in einem Chromatogramm auf dem Bildschirm. Die Zeit von der Injektion des Probenstoffes (Zeit 0) bis zum Verlassen der Säule bezeichnet man als Retentionszeit (RT). Die Identifizierung der Substanz erfolgt alleine über den Vergleich der Retentionszeiten mit zertifizierten Referenzsubstanzen und stellt somit eine recht unselektive und unspezifische Methode dar. Man kann nicht ausschließen, dass verschiedene Substanzen mit gleichen Retentionszeiten miterfasst werden. Im Falle des Cholesterins ist dies jedoch von geringerer Bedeutung, da die zusätzlich im Serum vorhandenen Sterine vergleichsweise in unbedeutender Konzentration vorliegen (Faktor 10^3 bis 10^4). Die Quantifizierung erfolgt über einen zu Beginn der Aufarbeitung zugesetzten internen Standard (5α -Cholestan), der physiologischerweise nicht im Serum enthalten ist, und der zu bestimmenden Substanz chemisch möglichst ähnlich ist.

2.6.3 Massenselektive Detektion

Bei der Kopplung des Gaschromatographen mit einem hochselektiven und –spezifischen MSD treten die verdampften Substanzen, wie z. B. Sterintrimethylsilyläther über ein beheiztes Interface in die Ionenquelle des als Detektor genutzten Massenspektrometers ein. Mit einer Elektronenenergie von 70 eV werden die Moleküle durch Elektronenstoßionisation

in ein positives Molekülion und weitere Fragmente (geladene und ungeladene) zerschlagen. Die geladenen Fragmente treten in einen Quadrupol-Analysator ein (Abb. 10). Die Iontrennung erfolgt darin durch Ablenkung mit Hilfe elektrischer Felder. Durch geeignete Abstimmung einer Gleich- und Wechselspannung passieren nur Ionen einer bestimmten Masse das Stabsystem (Massenfokussierung) (Rücker et al., 1992). Mit konstanter Abtastrate zeichnet das Massenspektrometer über den vorgewählten Massenbereich Spektren auf und liefert damit ein dreidimensionales Datenfeld aus Retentionszeit, Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) und relativer Intensität der für diese Substanz typischen Fragmente (Hübschmann, 1996).

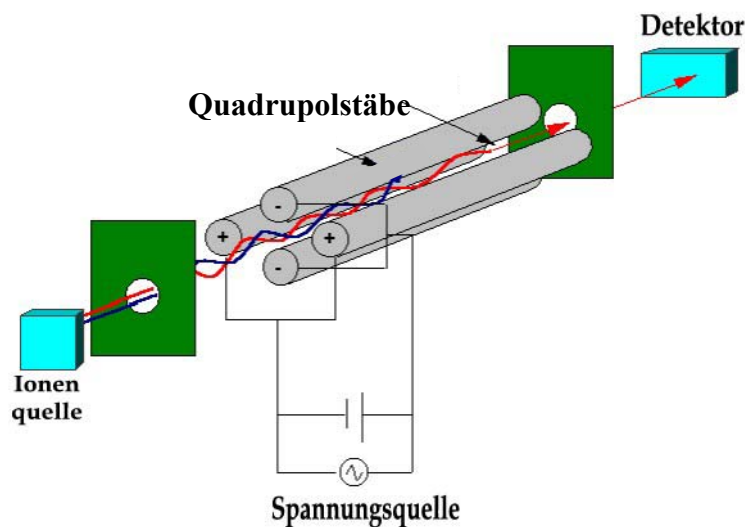


Abb.10 Schematische Darstellung eines massenselektiven Detektors (MSD)

In einem gegebenen Molekül werden bestimmte chemische Bindungen bevorzugt gespalten, so dass nur wenige Fragmentierungsabläufe begünstigt sind. Dies führt zu einem für die Substanz spezifischen Fragmentierungsmuster (Rücker et al., 1992). Nutzt man die Massenspektrometrie zur Strukturidentifizierung, muss eine kontinuierliche Aufnahme von Massenspektren über einen großen Massenbereich (z.B. 50-600 m/z) erfolgen (Scan-Modus), d.h. man registriert alle Ionen, in die eine Substanz zerfällt, nach Masse-Ladungs-Verhältnis und nach relativer Intensität. Dabei ist die Messzeit auf jeder Masse kurz. Das erhaltene Massenspektrum ist wie ein „Fingerabdruck“ für die zu untersuchende Substanz. Bei der Quantifizierung beschränkt man sich auf die Aufzeichnung von wenigen charakteristischen Massen, bei denen die Verbindung Fragmente höchster Intensität bildet (Selected Ion-Monitoring [SIM] Modus). Die Messzeit auf den ausgewählten und zyklisch registrierten

Massen wird verlängert und so die Empfindlichkeit der Messung um den Faktor 30 bis 50 gesteigert (Hübschmann, 1996).

Wegen der äußerst geringen Mengen, kompliziert zusammengesetzten Probenmatrix, der Vielfalt der Aufarbeitungsschritte und der Geräte bedingten Schwankungen führt man die quantitative Bestimmung von Cholesterinvorstufen und pflanzlichen Sterinen mit Epicoprostanol, einem physiologischerweise ebenfalls nicht vorkommenden, chemisch sehr ähnlichen Sterin und die Bestimmung von Oxysterinen mit mehrfach deuterierten Oxysterinen als internen Standards durch. Die mit stabilen Isotopen markierten Oxysterine weisen aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zu den nicht-deuterierten Substanzen das gleiche Verteilungsverhalten auf und unterscheiden sich von den authentischen Substanzen lediglich in der Masse ihrer Hauptfragmente, so dass sie massenspektrometrisch voneinander getrennt erfasst werden. Durch Dampfdruckisotopeneffekte weisen die deuterierten Isotope im Vergleich zu den nicht-deuterierten Substanzen leicht verkürzte Retentionszeiten auf (Hübschmann, 1996). Das Epicoprostanol und die stabilen Isotope werden den Proben ebenfalls vor Beginn der Aufarbeitung zugesetzt.

Das Massenspektrum der TMS-Derivate von 24S-OH-Chol und 27-OH-Chol im Vergleich zu ihren deuterierten Verbindungen ist in Abb. 14 dargestellt. Zur Interpretation eines Massenspektrums werden die intensitätsstärksten Ionen und die größten Fragmente gemessen, da letztere molekülspezifischer sind als kleinere Fragmente. Das Massenspektrum des TMS-Derivates von 24S-OH-Chol (Masse = 546) weist 2 Fragmente mit Massen von 503 und 456 auf, was einer Abspaltung der Isopropylgruppe [$M^+(-43)$] bzw. der Trimethylsilanolgruppe [$M^+(-90)$] entspricht (Abb. 11A). Diese Ionen weisen zwar höhere Massen aber geringere Intensitäten auf als das Fragment mit Masse 413. Dieses charakteristische Fragment höchster Intensität entsteht durch Abspaltung sowohl der Isopropyl- als auch der Trimethylsilanolgruppe [$M^+(-43)(-90)$] und wird daher im SIM-Modus hier massenselektiv detektiert. Das Molekülion [M^+] der Masse 546 tritt im Massenspektrum von 24S-OH-Chol sowie in dem von 27-OH-Chol auf, da beide Verbindungen gleiches Molekulargewicht besitzen. Das Fragment der Masse 456, welches durch Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe [$M^+(-90)$] aus dem TMS Derivat von 27-OH-Chol entsteht, hat die höchste Masse und Intensität und dient daher der Bestimmung von 27-OH-Chol (Abb. 11C). Die deuterierten Standards werden auf den gleichen Fragmenten, die jeweils um den Grad ihrer Markierung erhöhte Massen aufweisen, gemessen (Abb. 11B und 11D). Für den vierfach deuterierten Standard [$^{23,23,24,25-2}H_4$]24-OH-Chol reduziert sich die Markierung nach Fragmentierung auf eine dreifache Deuterierung, so dass das Fragment höchster Intensität die

Masse 416 aufweist. Bei $[15,16,17,20,22\text{-}^2\text{H}_5]27\text{-OH-Chol}$ bleibt auch nach der Fragmentierung die fünffache Deuterierung erhalten, die Verbindung wird daher auf der Masse 461 massenselektiv detektiert.

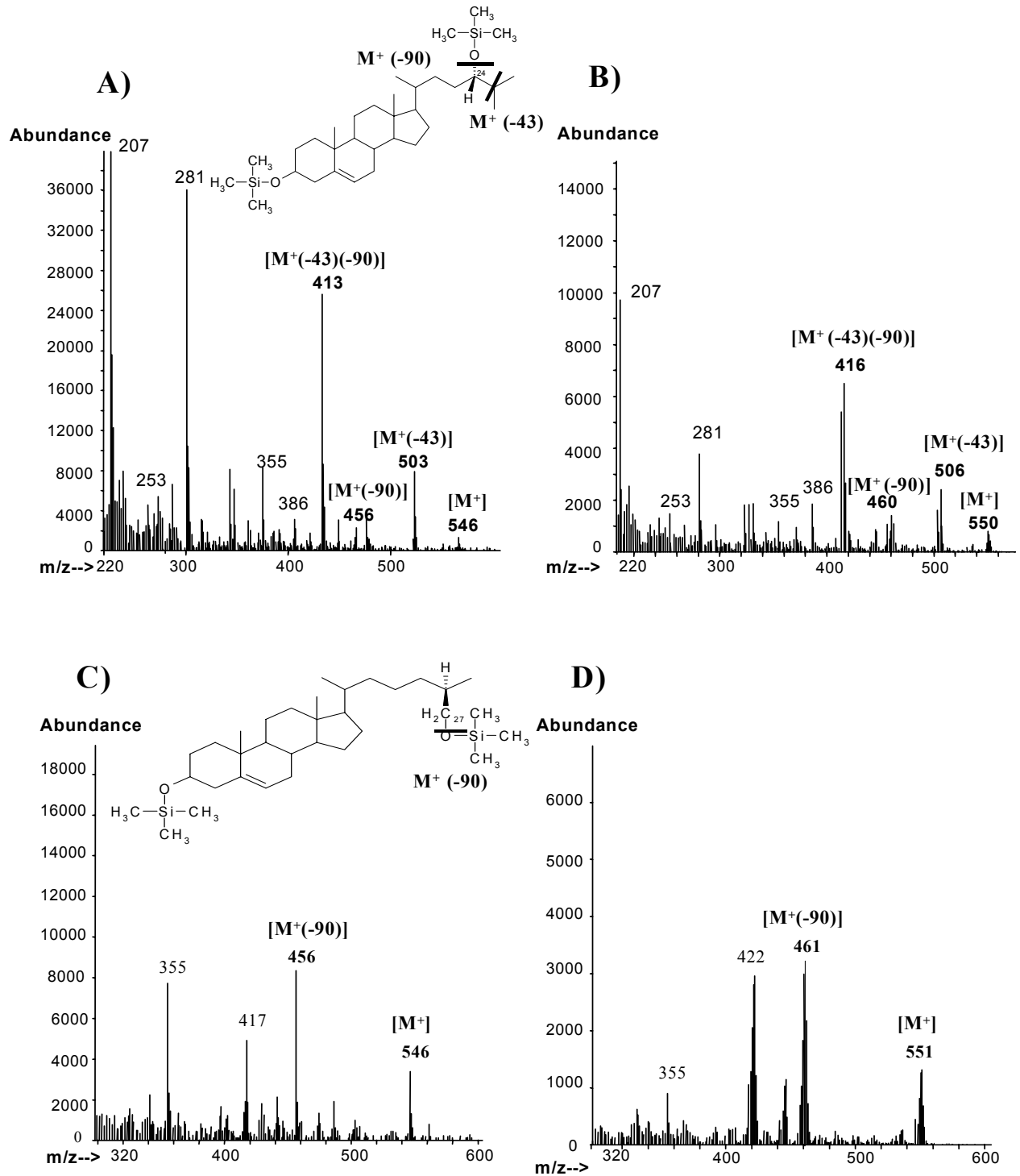


Abb. 11

Massenspektrum der Trimethylsilyl-Derivate von 24S-Hydroxycholesterin (A) und seiner vierfach deuterierten Verbindung (B) sowie von 27-Hydroxycholesterin (C) und seiner fünffach deuterierten Verbindung (D)

2.7 Durchführung der Analysen

2.7.1 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion

Das Sterintrimethylsilyläthergemisch wurde mit einem HP 7683 Injektor auf eine vernetzte Methylsilikon DB-XLB 122-1232 Kapillarsäule (J&W, Folsom, USA) (30m x 0,25 mm Innendurchmesser x 0,25 µm Schichtdicke) in einem Hewlett Packard Gaschromatographen (HP 6890) nach splittloser Injektion bei 280°C injiziert. Der Trägergasfluss – in unserem Falle: Wasserstoff - betrug 1,1 ml/min. Die Ofentemperatur wurde zu Beginn für 3 min bei 150°C gehalten und dann die Temperatur mit einer Steigerungsrate von 30°C/min auf eine Endtemperatur von 290°C geführt. Diese Temperatur blieb über 22,33 min konstant. Der interne Standard 5α-Cholestan wurde mit einer Retentionszeit von 12,0 min und der Cholesterintrimethylsilyläther mit einer Retentionszeit von 15,88 min im Flammenionisationsdetektor (FID) bei 280°C mit einem kombinierten konstanten Säulen- und Make-up-Fluss (Wasserstoff + Stickstoff; 30 ml/min) detektiert (Abb. 12). Die Steuerung des Gaschromatographen und die Auswertung der Gaschromatogramme sowie die Quantifizierung erfolgte durch die HP GC ChemStation Software (Version 2.1.1.0) auf einem Kayak XA Pentium II-Computer. Abbildung 15 zeigt eine gaschromatographische Trennung von 5α-Cholestan und Cholesterin. Zur **Quantifizierung** wird der integrierte Flächeninhalt des Cholesterinpeaks durch den Flächeninhalt des 5α-Cholestanpeaks dividiert und mit dem vorgegebenen Gehalt an internem Standard von 50 µg multipliziert. Dies ergibt den Gehalt an Cholesterin in µg pro Probe. Bei einer eingesetzten Menge von 200 µl muss man diesen Betrag noch auf 100 ml umrechnen, um die Cholesterinkonzentration in mg/dl anzugeben. Zur **Validierung dieser Einpunkt-Eichmethode** mit 5α-Cholestan als internem Standard wurden die Ergebnisse der Serumkonzentrationen von Cholesterin einer Einpunkt-Eichung gegenüber einer erstellten Eichgerade verglichen. Die Ergebnisse zeigten gute Übereinstimmung beider Eichverfahren. Abbildung 13 zeigt die Eichkurve für Cholesterin mit 5α-Cholestan als internem Standard in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 200 µg/Probe. Zur **Präzision der Methode** wurde die gleiche Serumprobe sechsfach aufgearbeitet und gemessen (Wiederholbarkeit), sowie eine aufgearbeitete Probe nach Silylierung sechsmal hintereinander injiziert um die Stabilität des Messinstrumentes zu zeigen. Für die Wiederholbarkeit der Einpunkt-Methode ergab sich ein Variationskoeffizient von 1,45 (n=6) und für die Stabilitätsmessung des GC-FID ein Variationskoeffizient von 1,6 (n=6). Die **Nachweisgrenze einer Substanz** wird normalerweise ermittelt, indem man bekannte niedrige Konzentrationen des Analyten mit substanzfreiem Medium gegenüberstellt und die minimale

Konzentration ermittelt, bei der der Analyt gerade noch erfasst werden kann. Ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 wird zur Bestimmung der Nachweisgrenze akzeptiert. Bei der Bestimmung von Cholesterin im Serum gibt es bezüglich der Nachweisgrenze für Cholesterin kein Problem. Daher wird die Nachweisgrenze (limit of detection) für die GC-FID-Methode auf < 0.1 mg/dl durch den niedrigsten Punkt unserer Eichkurve festgelegt. Für die **Bestimmungsgrenze** (Limit of quantitation) in biologischen Matrices wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 festgelegt. Der Einfluss der chromatographischen Basislinie kann für den Analyten Cholesterin vollständig vernachlässigt werden. Das Signal-Rausch-Verhältnis übersteigt hier die Bestimmungsgrenze erheblich. Die Reinheit der Referenzsubstanzen wurde mittels GC-FID und GC-MSD bestätigt und die Stammlösungen wurden bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt. Pipetten und Wägeeinheiten wurden turnusmässig validiert.

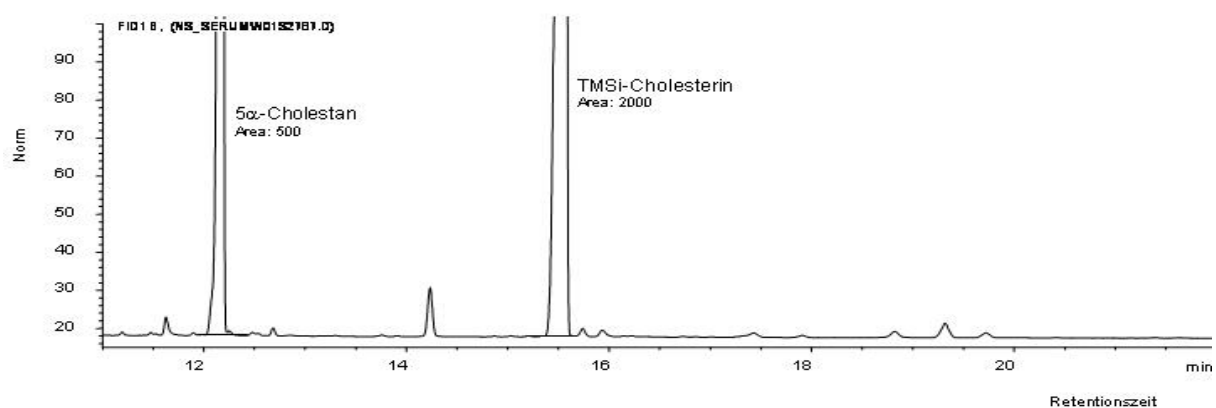


Abb. 12

Gaschromatogramm eines Serumsteringemisches

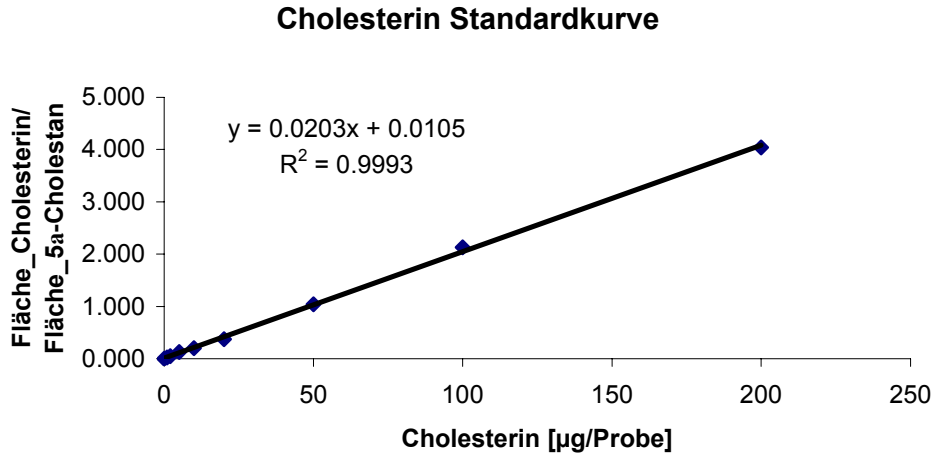


Abb. 13 Eichkurve für Cholesterin mit 5 α -Cholestan als Internem Standard

2.7.2 Durchführung der Analyse mittels Gaschromatographie-massenselektiver Detektion

Die säulenchromatographische Trennung des Sterin-/Stanolsilylgemisches erfolgte auf einer 30 m DB-XLB Kapillarsäule mit Helium als Trägergas. Der Trägergasfluss betrug 1.0 ml/min. Das Temperaturprogramm startete gleichfalls mit einer Temperatur von 150°C für 1 min und wurde mit einer Steigerungsrate von 30°C/min auf 290°C fortgeführt. Die Endtemperatur wurde über 30 Minuten gehalten. Die Injektor- und Transferlinientemperatur wurde auf 280°C fest eingestellt. Die Multiplierspannung lag bei 2700 Volt. Der Elektronenstrom an der Kathode betrug 220 mA und die Elektronenimpakt-Ionisationsspannung wurde auf 70eV festgelegt. Das Selected-Ion-Monitoring für ausgewählte selektive Ionen wurde im Daten-Acquirierungsprogramm so eingestellt, dass der Quadrupolmassenfilter mit einer Zyklusrate von 2,0 Zyklen/sek innerhalb der gewählten m/z-Werte arbeitete. Vor jeder größeren Analysensequenz wurde zur Optimierung der Messeigenschaften des MSD eine vorgegebene automatische Selbstjustierung mittels einer definierten Substanz (PFTBA) in Form eines „Autotunes“ durchgeführt. Der SIM-Modus wurde mit dem Ion m/z 370 für Epicoprostanol begonnen. In Tabelle 2 sind die Retentionszeiten und spezifischen Massen für jede gemessene Substanz aufgelistet.

Tabelle 2 Parameter zur gaschromatographischen Trennung und massenselektiven Detektion von Trimethylsilylsterin- und stanoläthern

No.	TMSi-Äther von	Kategorie	Retentionszeit [min]	m/z Werte
1	Epicoprostanol	ISTD	16,9	370
2	Cholestanol	Cholesterinmetabolit	18,9	306, 460
3	Desmosterin	Cholesterinvorstufe	19,6	441
4	Lathosterin	Cholesterinvorstufe	20,3	458
5	Campesterin	Phytosterin	21,3	472
6	Lanosterin	Cholesterinvorstufe	23,8	393
7	Sitosterin	Phytosterin	23,8	486
8	[² H ₄]24R,S-Hydroxycholesterin	ISTD	25,0	416
9	24S-Hydroxycholesterin	Cholesterinmetabolit	25,1	413
10	[² H ₄]27-Hydroxycholesterin	ISTD	28,7	461
11	27-Hydroxycholesterin	Cholesterinmetabolit	28,9	456

Für jedes zu messende Sterin, Stanol und Oxysterin wurde eine eigene Eichgerade erstellt, die darüber Aufschluss gab, ob integrierte Peakflächen und eingesetzte Substanzkonzentrationen linear verlaufen. Dies ist Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung. Steigende Mengen an Sterinen, Stanolen und unmarkierten Oxysterinen, denen je gleiche Mengen an Epicoprostanol bzw. mit stabilen Isotopen markiertes 24R,S-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin zugesetzt wurden, wurden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie im SIM-Modus gemessen und das Verhältnis der Peakfläche des unmarkierten zu der des jeweiligen Internen Standards gegen die eingesetzten Substanzmengen (ng) aufgetragen.

Zur **Identifizierung** der jeweiligen Substanzen wurde die Identität der Massenspektren aller Substanzen, die mittels GC-MSD-SIM aus Serumproben bestimmt wurden, durch den Vergleich der Massenspektren mit authentischen Referenzsubstanzen bestätigt. Selbst Analyte, die gaschromatographisch nicht eindeutig voneinander abgetrennt werden konnten, konnten aufgrund ihrer spezifischen Massen voneinander unterschieden und quantifiziert werden. Somit konnte z. B. das Lanosterin neben dem Sitosterin bei sehr nahe beieinanderliegenden Retentionszeiten unterschieden werden.

Die Linearität der Eichkurven, die **Spannweite** und die **Quantifizierungsgrenze (QG)** wurde für jede einzelne Substanz überprüft und wir erhielten für die Sterine und Stanole folgende Charakteristika:

Tabelle 3 Eichgeradencharakteristika und Nachweisgrenzen

Analyt	Achsenabschnitt	Steigung	R ²	Spannweite	QG
Cholestanol	-0,0002	0,1486	0,9999	0,04-9.0 mg/dl	0,02 µg/dl
Desmosterin	-0,0051	0,1453	0,9999	0,06-8.1 mg/dl	0,06 µg/dl
Lathosterin	-0,004	0,760	0,9999	0,01-3.2 mg/dl	0,02 µg/dl
Campesterin	-0,0025	0,2451	0,9999	0,02-55.6 mg/dl	0,02 µg/dl
Lanosterin	-0,0071	0,7107	0,9999	0,01-0,95 mg/dl	0,02 µg/dl
Sitosterin	-0,0056	0,2221	0,9999	0.35-83.9 mg/dl	0,06 µg/dl
24S-OH-Chol	0,022	0,0053	0,9996	7-210 ng/ml	8 ng/ml
27-OH-Chol	0,0218	0,0044	0,9998	12-360 ng/ml	10 ng/ml

Für 24S- und 27Hydroxycholesterin zeigen die abgebildeten Eichgeraden (Abbildung 14) und die errechneten Korrelationskoeffizienten (r), dass Peakflächenratios und 24S-OH-Chol- bzw. 27-OH-Chol-Mengen in den Bereichen 7-210 ng (r = 0,9996) bzw. 12-360 ng (r = 0,9998) linear ansteigen.

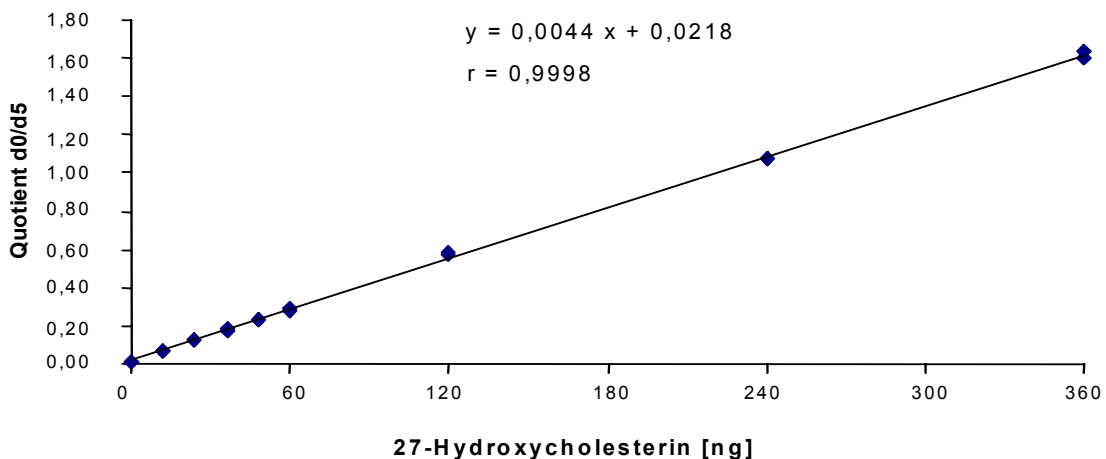
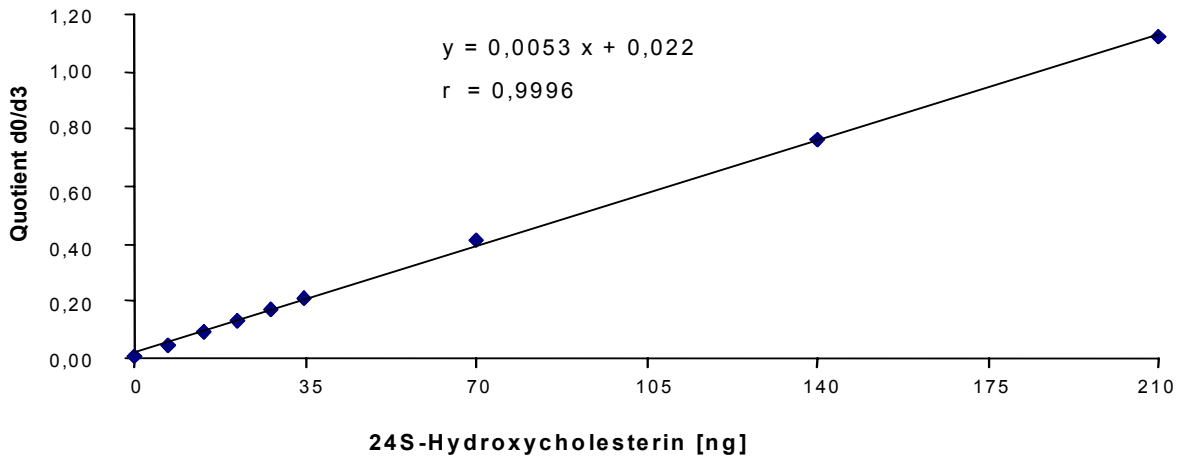


Abb. 14 Beispiele von Eichgeraden für 24S- und 27-Hydroxycholesterin

Um zu testen, ob die Probenmatrix einen Einfluß auf die Meßergebnisse hat, wurden fünf Serumaliquoten, entsprechend der Eichkurve, aufsteigende Mengen der zu analysierenden Verbindung hinzugesetzt (**Additionsverfahren**) (Hübschmann, 1996). Dies wird hier wiederum am Beispiel von 24S- und 27-OHChol dargestellt. Nach Bestimmung der 24S- und 27-Hydroxycholesterinkonzentration wurde die Aufstockungsgerade mit der Kalibrierungsgerade verglichen (Abb. 15). Im Idealfall verlaufen die beiden Geraden parallel, d.h. sie haben die gleiche Steigung.

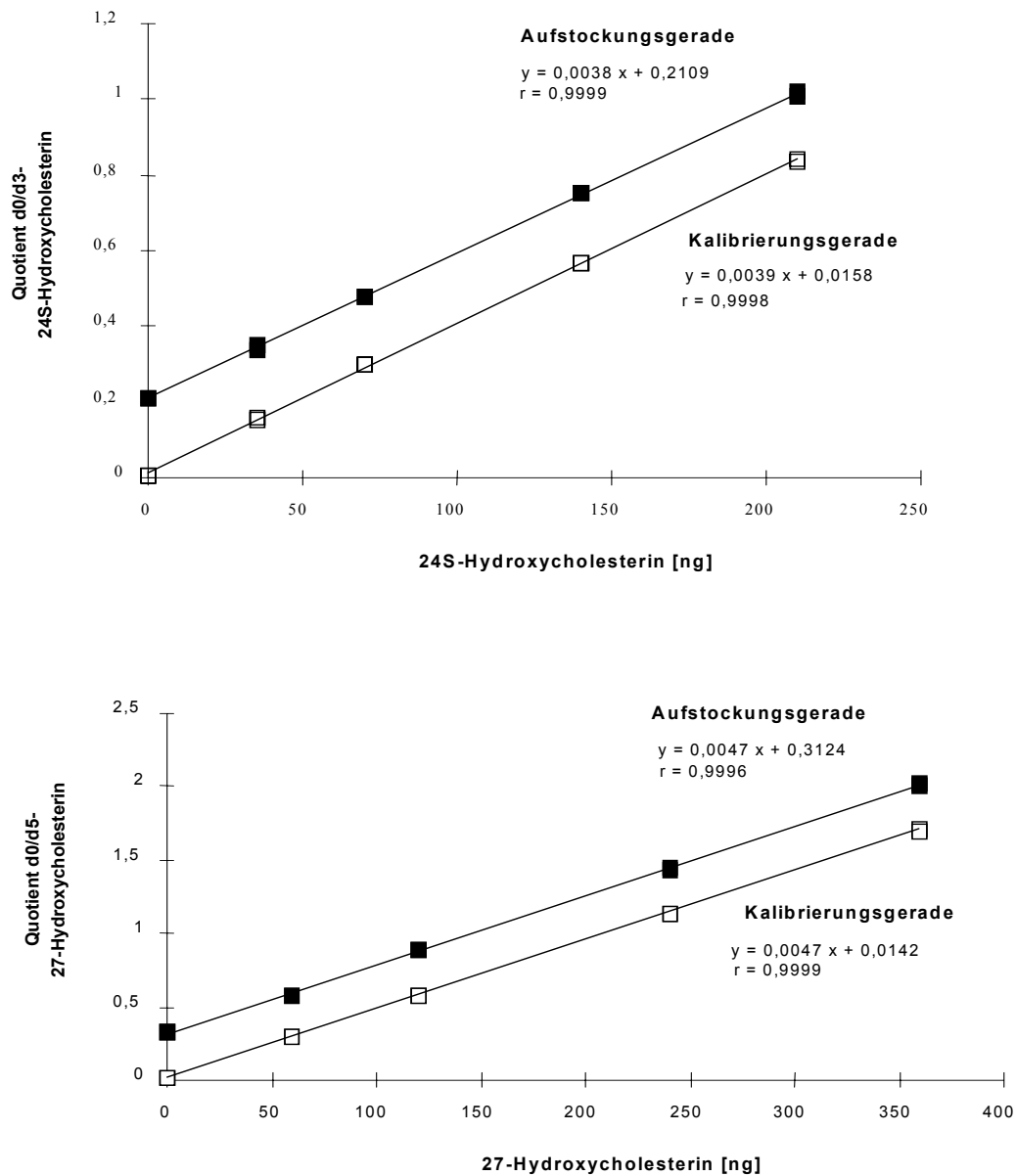


Abb. 15

Aufstockungsgeraden für 24S- und 27-Hydroxycholesterin

2.8 Statistik

Alle Originaldaten wurden in Excel-Dateien eingetragen und in eine SPSS- (Statistical Package for the Social Sciences, Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) Basisdatei zu weiteren statistischen Betrachtungen übertragen. Die Daten erscheinen in den Tabellen und Abbildungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung oder als Median [Minimalwert-Maximalwert]. Die prozentualen Änderungen zwischen dem Basis- und Endwert im 24-monatigen Verlauf werden als Mittelwert der einzelnen prozentualen Abweichungen angegeben. Der Vergleich der Basiswerte innerhalb der verschiedenen Therapiegruppen (Plazebo, Rlx 60, Rlx 150 und HRT) erfolgte unter Verwendung von parametrischen Standardtests. In der Rlx 60-Gruppe nahmen die Probandinnen innerhalb der zweijährigen Studiendauer im Mittel signifikant an Gewicht zu. Deshalb wurde auch diese Änderung des Body-Mass Index (Δ BMI) in die folgende Analyse einbezogen (Tabelle 4). Vor Durchführung der folgenden Varianzanalyse wurden die zum 2-Jahreszeitpunkt fehlenden Gewichtswerte von 10 Frauen um die 12-Monatswerte ergänzt. Die Varianzanalyse für wiederholte Messungen unter Einschluss von Kovariate(n) (ANCOVA) wie Basiswerte, Raucherstatus, Serumkonzentrationen von 17β -Östradiol, sowie Δ BMI, wurden zum Vergleich zwischen den 4 Therapiegruppen herangezogen. Mit dieser Prozedur, die von einem allgemeinen linearen Modell ausgeht, werden Nullhypothesen über die Auswirkungen von Faktorvariablen auf die Mittelwerte verschiedener Gruppierungen einer gemeinsamen Verteilung von abhängigen Variablen getestet. Hierdurch können sowohl die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren als auch die Auswirkungen einzelner Faktoren untersucht werden. Außerdem werden die Auswirkungen von Kovariaten und Wechselwirkungen zwischen Kovariaten und Faktoren berücksichtigt. Weitere Varianzanalysen zwischen den verschiedenen Abnahmezeitpunkten innerhalb der 24 Monate wurde für jede Therapiegruppe gegenüber der Plazebogruppe durchgeführt. Ein Vergleich der Basiswerte zwischen den Therapiegruppen wurde durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) vollzogen. Mit der Varianzanalyse wird die Hypothese überprüft, daß mehrere Mittelwerte gleich sind bzw. keine signifikanten Unterschiede zwischen den Basiswerten der einzelnen Therapiegruppen bestehen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikanter Wert angenommen. In der Originaluntersuchung basierte die Kalkulation der Teilnehmeranzahl auf den erwarteten Änderungen in der Knochenmineraldichte und der Endometriumdicke als Primärziel. Da es in der Literatur keinerlei Angaben über Hormonersatztherapie und Cholesterinvorstufen und -metabolite bei

postmenopausalen Frauen gibt, wurde für diese Substudie keine eigene Powerkalkulation durchgeführt.

Tabelle 4 Body Mass Indizes (BMI) über den 24-monatigen Studienverlauf

BMI [kg x m ⁻²]	Basiswert	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert^b	p – Wert^c	p – Wert^d
Plazebo	26,4 ± 4,4 ^a	25,9 ± 4,3	26,0 ± 4,3	26,4 ± 4,6	0,872		
Rlx 60^e	23,9 ± 2,8	24,5 ± 3,1	24,8 ± 3,0	25,2 ± 3,2	0,011	0,004	
Rlx 150^e	25,3 ± 3,7	25,3 ± 3,9	25,2 ± 3,6	25,4 ± 3,3	0,789	0,382	
HRT^e	25,0 ± 2,4	24,7 ± 2,6	24,9 ± 2,5	24,7 ± 1,8	0,428	0,902	0,005
	0,163 ^f	0,634	0,700	0,517			

^a MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung

^b Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten

^c ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten als konstante Kovariate

^d ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten als konstante Kovariate

^e Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

^f Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede zwischen den Gruppen zum Basiszeitpunkt, nach 6, 12, bzw. 24 Monaten

3. ERGEBNISSE

3.1 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf – graphische Darstellung und Interpretation der Ergebnisse

3.1.1 Serumkonzentrationen von Cholesterin

Der Verlauf der Mittelwerte der absoluten Serumkonzentrationen für Cholesterin, seiner Vorstufen Lathosterin, Lanosterin und Desmosterin, seiner Metaboliten Cholestanol, 24S-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin, sowie der pflanzlichen Sterine Campesterin und Sitosterin über die 24 Monate sind im Folgenden graphisch dargestellt. Ferner wird das Verhältnis der einzelnen Sterine zu Cholesterin als Ratio Sterin/Cholesterin gezeigt.

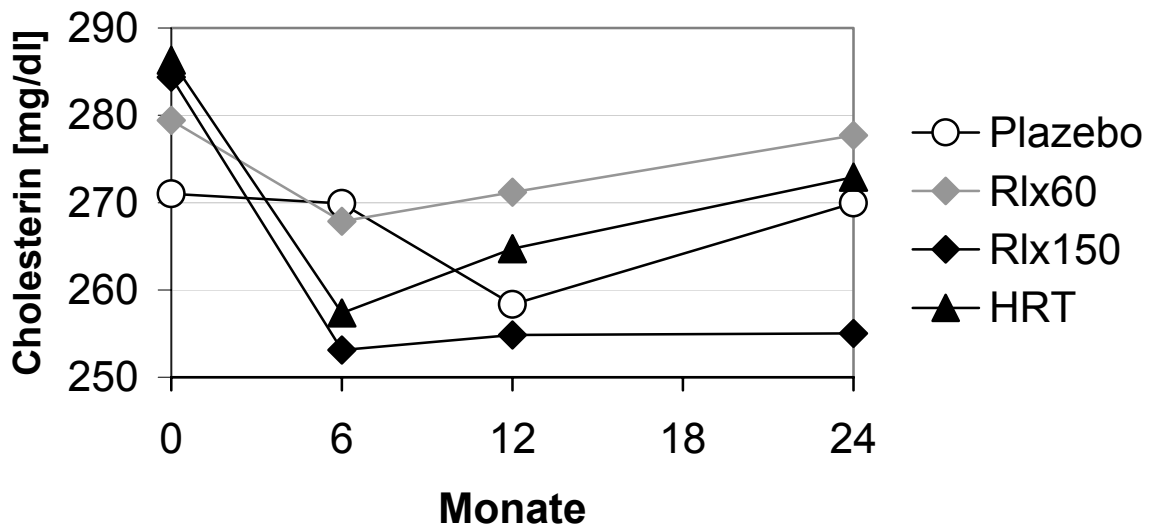


Abb. 16 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Placebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

Die mittlere Serumkonzentration von Cholesterin in der Rlx 150-Therapiegruppe ist nach 24 Monaten signifikant um 10,1% ($p = 0,002$) gesenkt worden (Abb. 16). In der Varianzanalyse im Vergleich zur Placebo-Gruppe ergab sich mit $p = 0,015$ eine signifikante Änderung, in der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,033 (Tabelle 5).

3.1.2 Serumkonzentrationen von Lathosterin und seiner Ratio zu Cholesterin

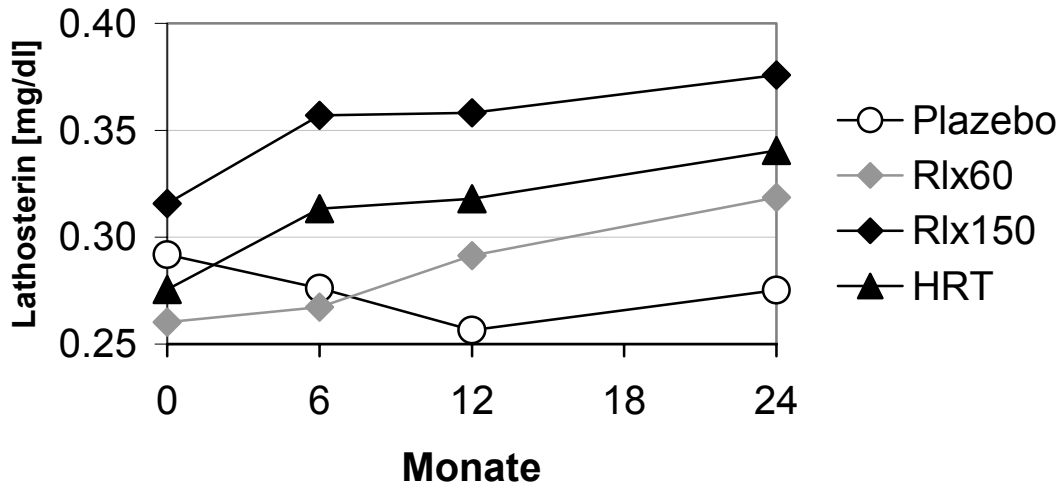


Abb. 17 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Lathosterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

Die mittlere Serumkonzentration von Lathosterin in der Rlx 60-Therapiegruppe ist nach 24 Monaten signifikant um 28,7% ($p = 0,019$) angestiegen (Abb. 17), während in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,157$ keine signifikante Änderung zu erkennen war (Tabelle 6). In der Rlx 150-Therapiegruppe wurde die Lathosterinkonzentration um 24,7% ($p = 0,015$) erhöht und es ergab sich mit $p = 0,007$ in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe ein signifikanter Unterschied. In der HRT-Gruppe stieg die mittlere Lathosterinkonzentration um 21,1% an ($p = 0,027$) und die Varianzanalyse ergab im Vergleich zur Plazebo-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p = 0,005$). In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,009 (Tabelle 6).

Die mittlere Ratio von Lathosterin zu Cholesterin in der Rlx 60-Therapiegruppe stieg um 28,6% nach 24 Monaten signifikant ($p = 0,004$) an (Abb. 18), während in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,109$ auch hier keine signifikante Änderung zu erkennen war (Tabelle 6). In der Rlx 150-Therapiegruppe stieg die mittlere Ratio von Lathosterin zu Cholesterin um 40,1% ($p = 0,001$) und in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied von $p < 0,001$. In der

HRT-Gruppe stieg die mittlere Ratio von Lathosterin zu Cholesterin um 27,8% an ($p = 0,006$) und auch die Varianzanalyse zeigte im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,001$ einen signifikanten Unterschied. In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert $< 0,001$ (Tabelle 6).

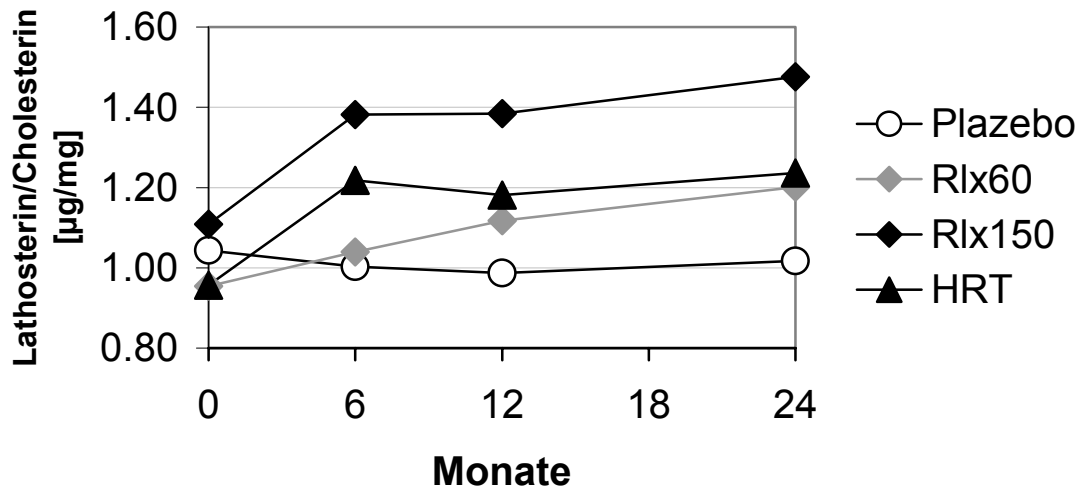


Abb. 18 Verlauf der Ratio Lathosterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.3 Serumkonzentrationen von Lanosterin und seiner Ratio zu Cholesterin

In den mittleren Serumkonzentrationen von Lanosterin und deren Ratio zu Cholesterin ergaben sich im Studienverlauf und im Vergleich der Therapiegruppen untereinander keinerlei signifikante Unterschiede (Abb. 19 und 20, Tabelle 7).

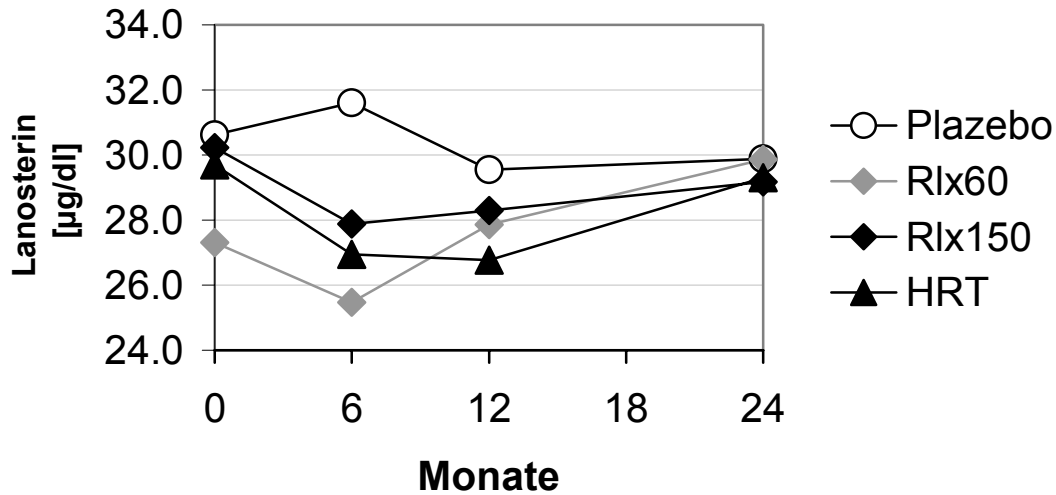


Abb. 19 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Lanosterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

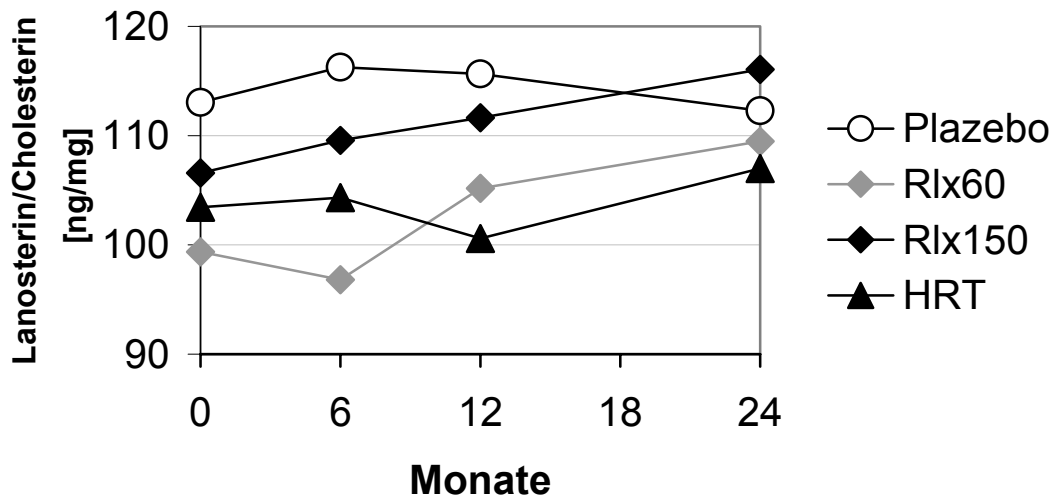


Abb. 20 Verlauf der Ratio Lanosterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.4 Serumkonzentrationen von Desmosterin und seiner Ratio zu Cholesterin

Auch in den mittleren Serumkonzentrationen von Desmosterin und deren Ratio zu Cholesterin ließen sich im Studienverlauf und im Vergleich der Therapiegruppen untereinander keinerlei signifikante Unterschiede erkennen (Abb. 21 und 22, Tabelle 8).

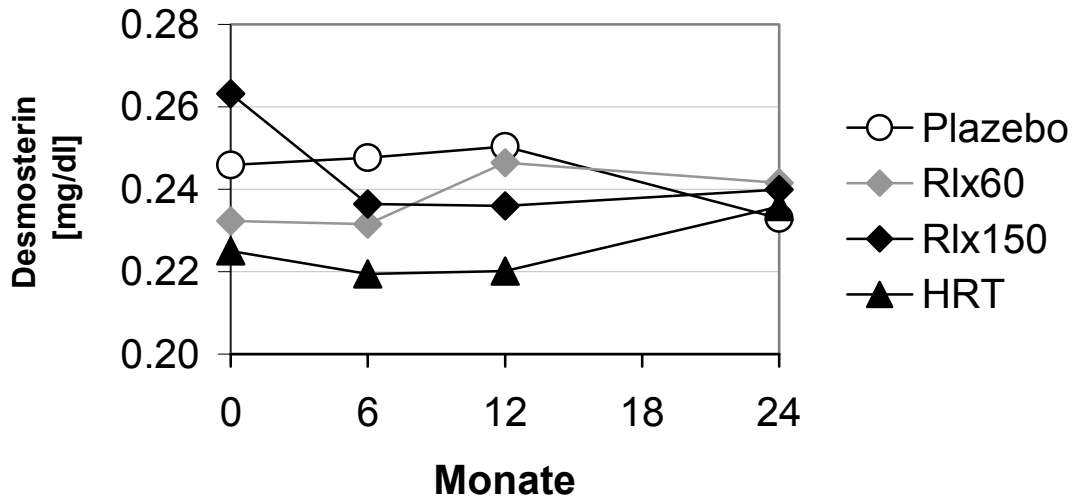


Abb. 21 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Desmosterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

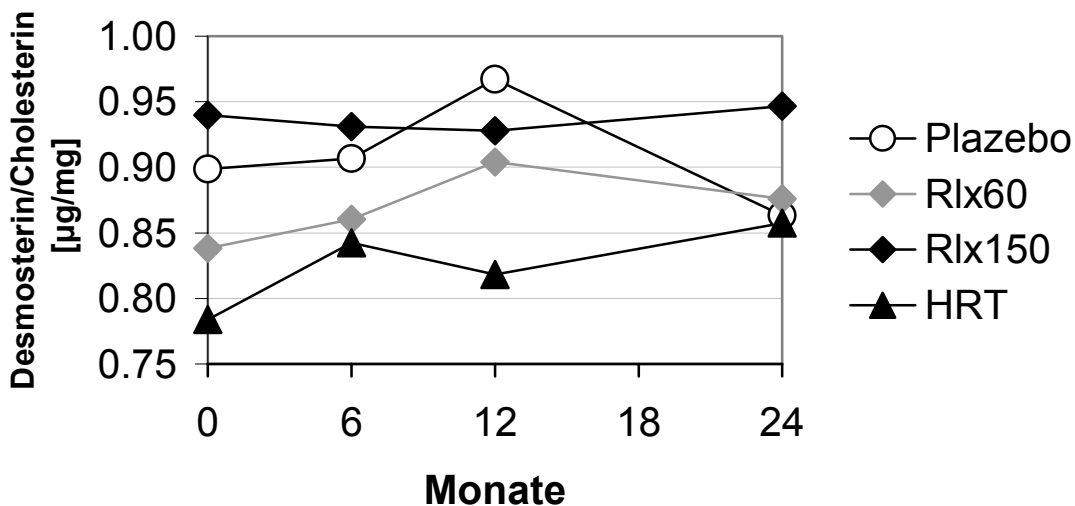


Abb. 22 Verlauf der Ratio Desmosterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.5 Serumkonzentrationen von Cholestanol und seiner Ratio zu Cholesterin

Die mittlere Serumkonzentration von Cholestanol in der Rlx 150-Therapiegruppe ist nach 24 Monaten signifikant um 15,1% ($p = 0,002$) gesunken (Abb. 23) und in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,002$ eine signifikante Änderung zu erkennen (Tabelle 9). In der HRT-Therapiegruppe wurde die Cholestanolkonzentration um 12,3% gesenkt. Dies war im gepaarten T-test zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach 24 Monaten nicht signifikant, jedoch ergab sich mit $p = 0,012$ in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe ein signifikanter Unterschied. In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,002 (Tabelle 9).

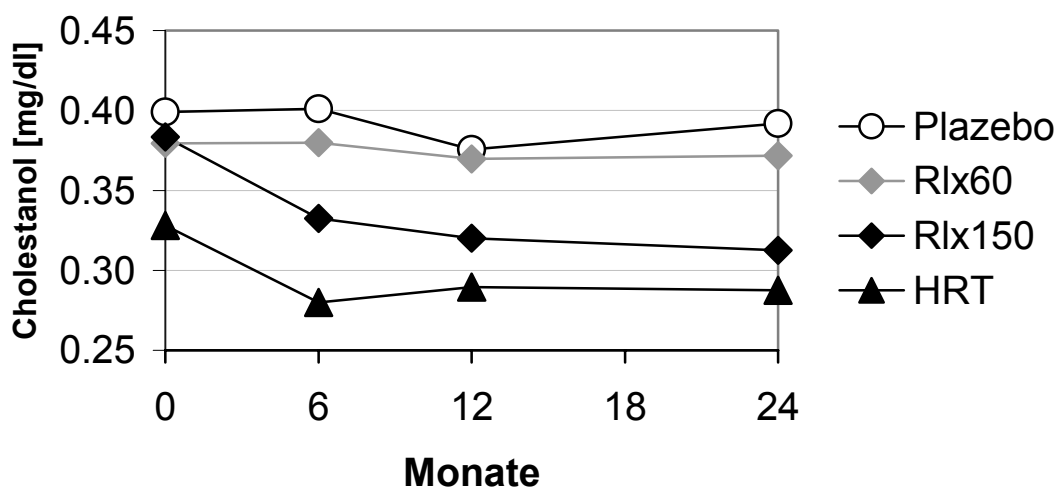


Abb. 23 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Cholestanol über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

Die mittlere Ratio von Cholestanol zu Cholesterin in der Rlx 150-Therapiegruppe ist nach 24 Monaten signifikant um 5,2% ($p = 0,036$) gesunken (Abb. 24) jedoch in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,073$ keine signifikante Änderung zu erkennen (Tabelle 9). In der HRT-Therapiegruppe ergab sich mit $p = 0,021$ in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe ein signifikanter Unterschied der Senkung um 8,4% des Ausgangs- zum Endwert, welcher jedoch im gepaarten T-Test mit 0,176 nicht signifikant war. In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,034 (Tabelle 9).

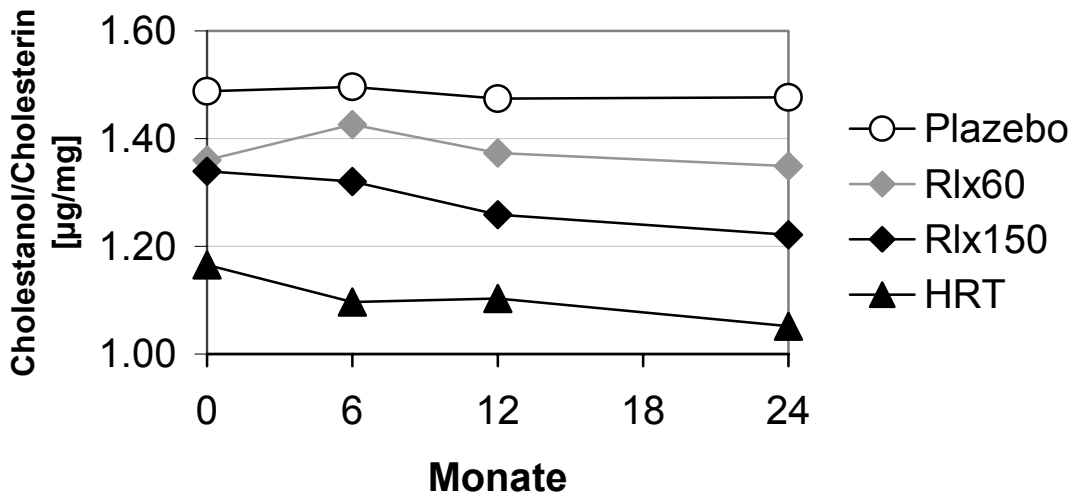


Abb. 24 Verlauf der Ratio Cholestanol zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.6 Serumkonzentrationen von 24S-Hydroxycholesterin und seiner Ratio zu Cholesterin

Die mittlere Serumkonzentration von 24S-Hydroxycholesterin in der Plazebogruppe ist nach 24 Monaten signifikant um 7,1% ($p = 0,023$) gesunken (Abb. 25). In der Rlx 150-Gruppe ergab sich im Verlauf ein signifikanter Unterschied von -9,9% ($p = 0,011$), während in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,886$ kein signifikanter Unterschied zu erkennen war (Tabelle 10). In der HRT-Therapiegruppe ergab sich im Verlauf ein 10,0%-iger Abfall der Serumkonzentration ($p = 0,018$). Die Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe sowie im Vergleich aller Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 10).

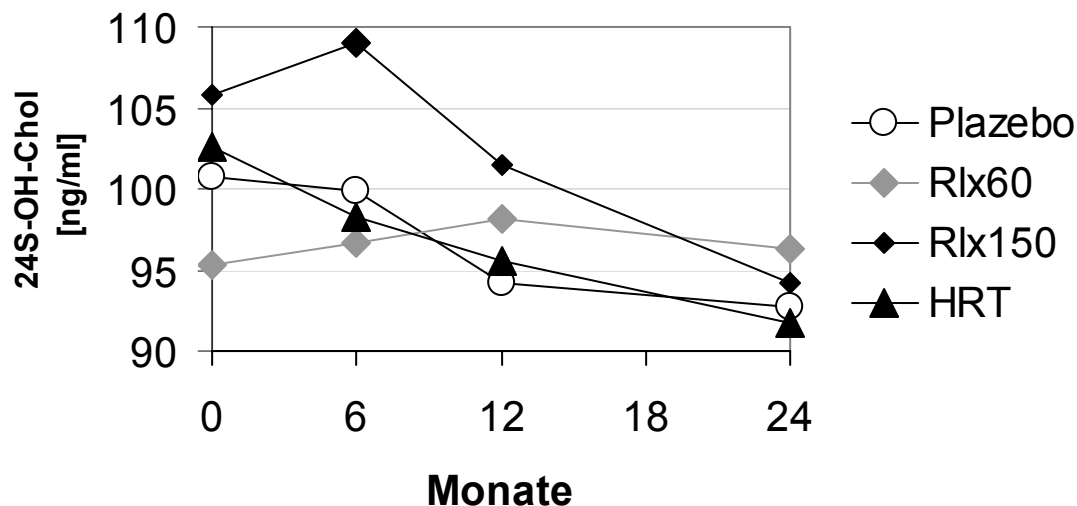


Abb. 25 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für 24S-Hydroxycholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

Die mittlere Ratio von 24S-Hydroxycholesterin zu Cholesterin in der Plazebogruppe ist nach 24 Monaten hochsignifikant um 7,9% ($p < 0,001$) gesunken (Abb. 26). In der Rlx 60 Gruppe war lediglich die Varianzanalyse mit $p = 0,019$ signifikant. In der Rlx 150-Gruppe ergab sich ebenfalls nur in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,002$ ein signifikanter Unterschied (Tabelle 10). Im Vergleich aller Gruppen zeigte die Varianzanalyse einen signifikanten Unterschied von $p = 0,015$.

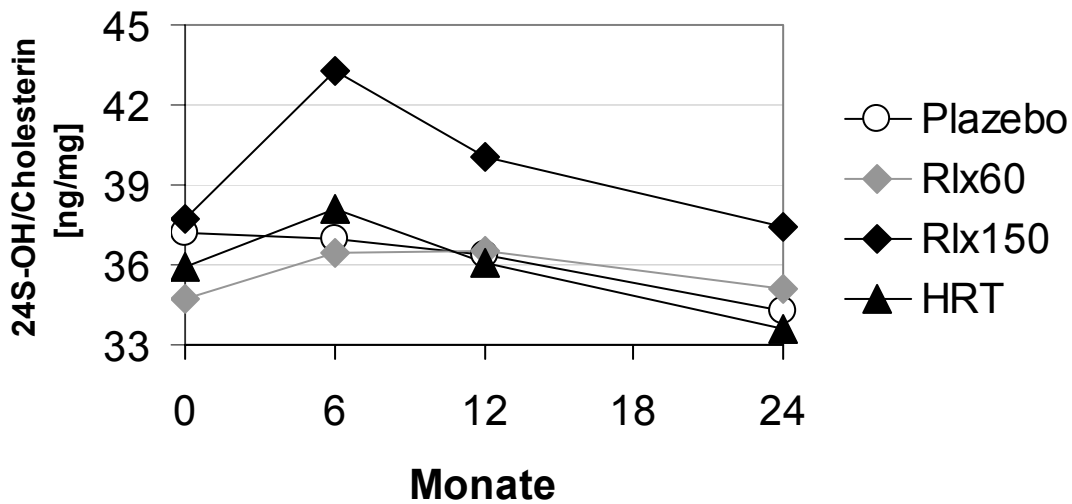


Abb. 26 Verlauf der Ratio 24S-Hydroxycholesterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.7 Serumkonzentrationen von 27-Hydroxycholesterin und seiner Ratio zu Cholesterin

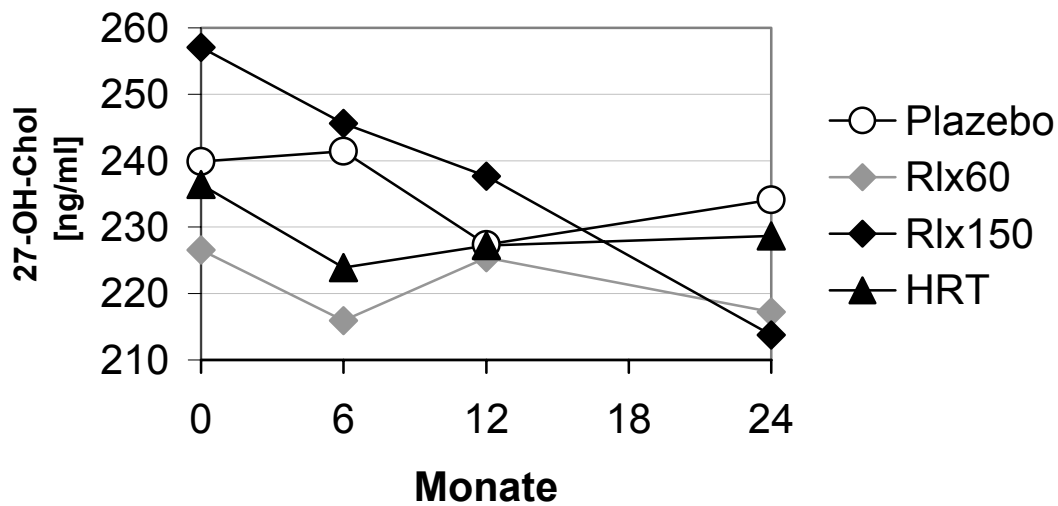


Abb. 27 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für 27-Hydroxycholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

Nur in der Rlx 150-Gruppe ergab sich im 24-monatigen Verlauf eine mit $p = 0,003$ signifikante Absenkung der Serumkonzentrationen von 27-Hydroxycholesterin um 14,3% (s. Abb. 27). Die Varianzanalysen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 11).

Die mittlere Ratio von 27-Hydroxycholesterin zu Cholesterin ergab weder in den einzelnen Gruppen noch im Gruppenvergleich signifikante Änderungen (Abb. 28, Tabelle 11).

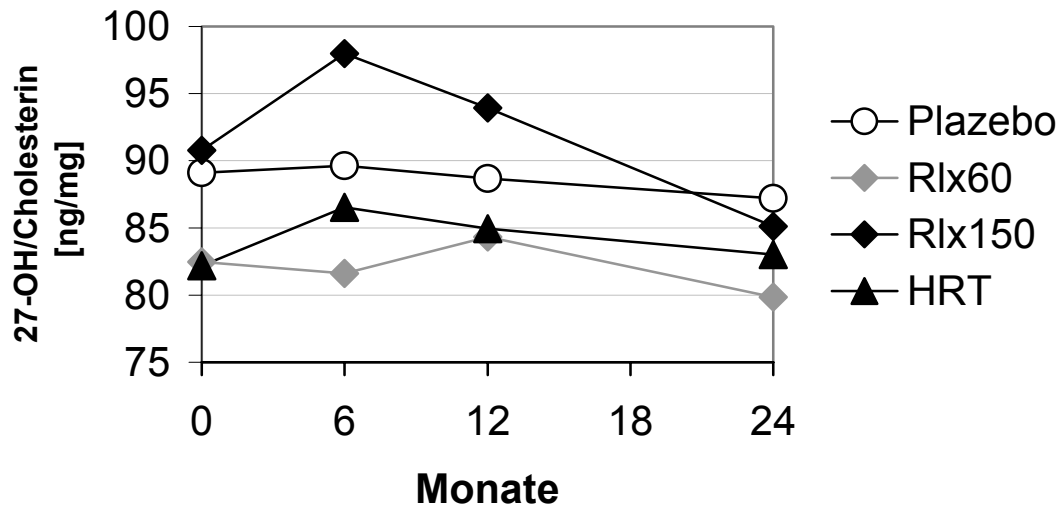


Abb. 28 Verlauf der Ratio 27-Hydroxycholesterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.8 Serumkonzentrationen von Campesterin und seiner Ratio zu Cholesterin

In der Rlx 150-Therapiegruppe ergab sich für die mittlere Campesterinkonzentration nur in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,012$ ein signifikanter Unterschied (Abb. 29). In der HRT-Gruppe sank die mittlere Campesterinkonzentration um 14,3% ($p = 0,028$) und die Varianzanalyse zeigte im Vergleich zur Plazebo-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p = 0,004$). In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert $< 0,001$ (Tabelle 12).

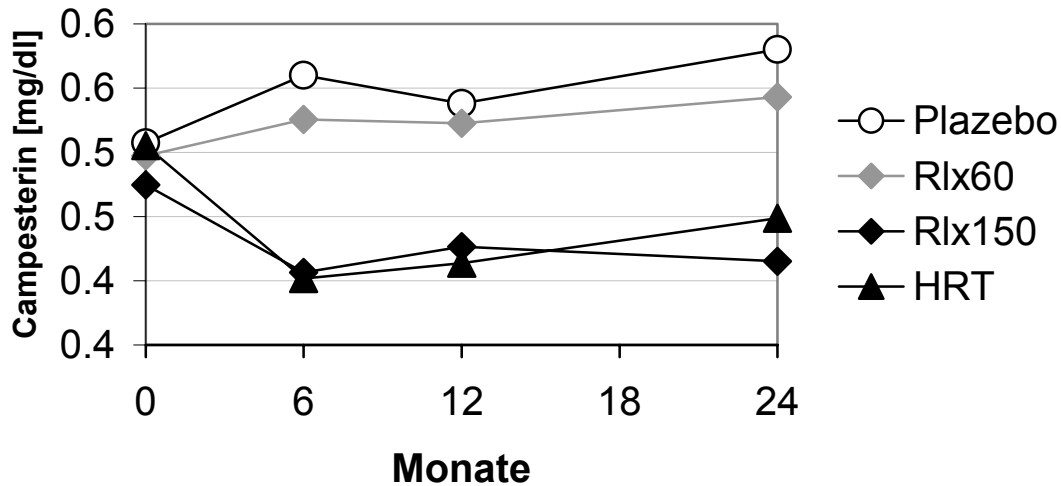


Abb. 29 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Campesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

In der HRT-Gruppe sank die mittlere Ratio von Campesterin zu Cholesterin um 9,7% ($p = 0,031$) und die Varianzanalyse ergab im Vergleich zur Plazebo-Gruppe einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,009$ (Abb. 30). In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,015 (Tabelle 12).

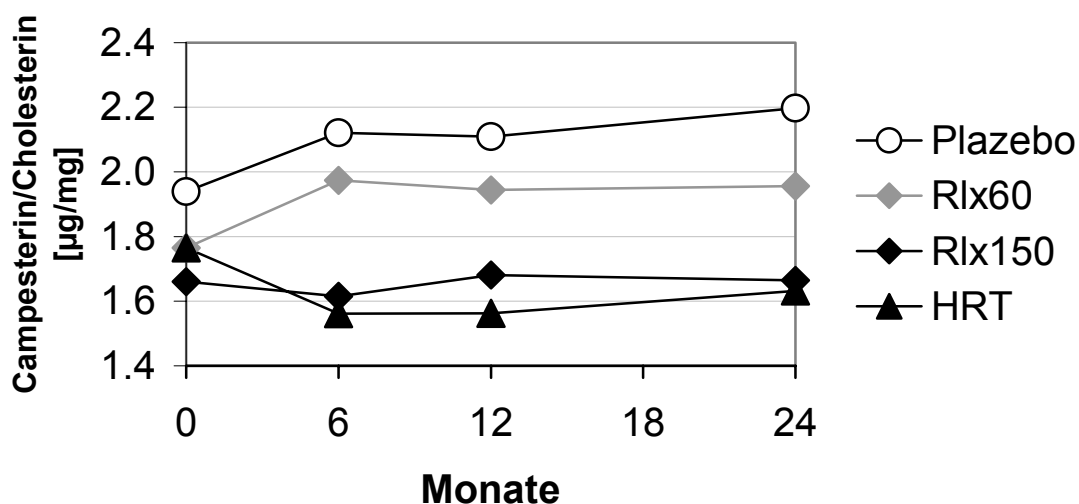


Abb. 30 Verlauf der Ratio Campesterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.1.9 Serumkonzentrationen von Sitosterin und seiner Ratio zu Cholesterin

In der Rlx 150-Therapiegruppe ergab sich im Verlauf der mittleren Sitosterinkonzentration eine Absenkung um 9,8% ($p = 0,039$) und in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe mit $p = 0,010$ ebenfalls ein signifikanter Unterschied (Abb. 31). In der HRT-Gruppe zeigte die Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebo-Gruppe einen signifikanten Unterschied von $p = 0,005$. In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,003 (Tabelle 13).

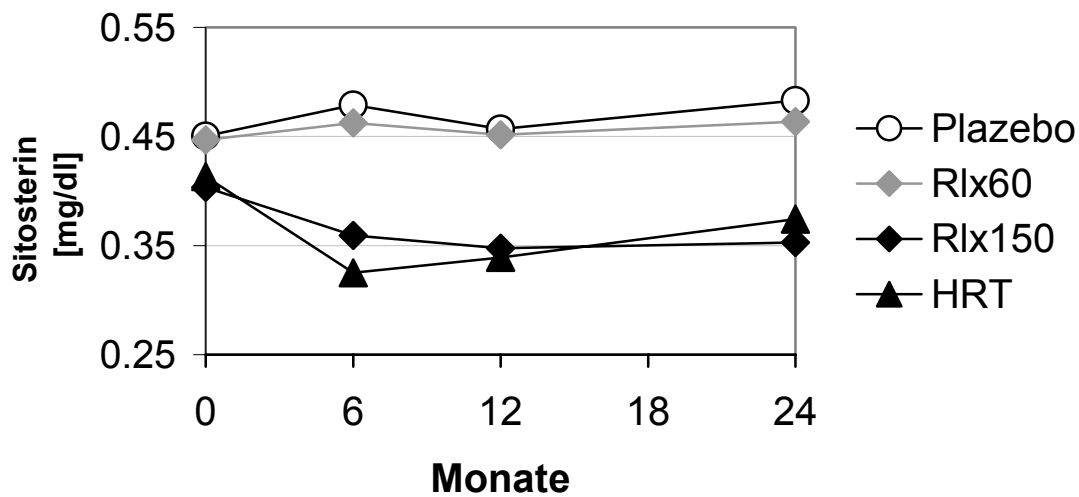


Abb. 31 Verlauf der Mittelwerte der Serumkonzentrationen für Sitosterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

Nur in der HRT-Gruppe zeigte die Varianzanalyse der Ratio von Sitosterin zu Cholesterin im Vergleich zur Plazebo-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p = 0,024$)(Abb. 32). In der Varianzanalyse im Vergleich aller Gruppen betrug der p -Wert 0,022 (Tabelle 13).

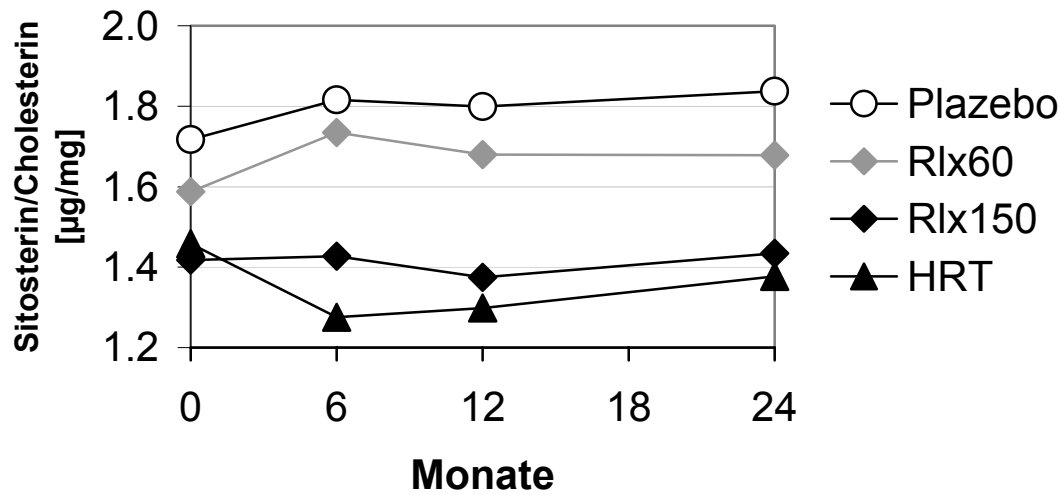


Abb. 32 Verlauf der Ratio Sitosterin zu Cholesterin über den 24 monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den Therapiegruppen Raloxifen 60 mg (Rlx60), Raloxifen 150 mg (Rlx150) und Hormonersatztherapie (HRT)

3.2 Serumkonzentrationen von Sterinen und deren Ratio zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf – tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 5 Serumkonzentrationen von Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf unter Plazebo und den drei Therapiegruppen

	Basiswert^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert^c	p – Wert^d	p – Wert^e
Cholesterin [mg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	271 ± 45 272 [190-384]	270 ± 34 267 [199-341]	258 ± 38 254[192-338]	270 ± 46 273 [208-384]	0,979		
Rlx 60^f	279 ± 58 297 [194-383]	268 ± 54 266 [153-341]	271 ± 60 271 [169-379]	278 ± 60 280[190-401]	0,772	0,836	
Rlx 150^f	284 ± 40 296[191-335]	253 ± 28 252[203-293]	255 ± 34 259[187-317]	255 ± 43 256[163-346]	0,002	0,015	
HRT^f	286 ± 46 280[218-383]	257 ± 34 257[183-326]	265 ± 38 262[193-342]	273 ± 28 268[232-329]	0,107	0,511	0,033

^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied

^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung

^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten

^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten

^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten

^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 6 Serumkonzentrationen von Lathosterin und der Ratio Lathosterin zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert ^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert ^d	p – Wert ^e
Lathosterin [mg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	0,29 ± 0,17 0,24[0,16-0,73]	0,28 ± 0,14 0,24[0,13-0,69]	0,26 ± 0,10 0,23[0,14-0,53]	0,28 ± 0,12 0,24[0,15-0,57]	0,430		
Rlx 60 ^f	0,26 ± 0,13 0,26[0,15-0,49]	0,27 ± 0,09 0,25[0,11-0,47]	0,29 ± 0,11 0,27[0,14-0,54]	0,32 ± 0,12 0,31[0,15-0,65]	0,019	0,157	
Rlx 150 ^f	0,32 ± 0,15 0,29[0,13-0,66]	0,36 ± 0,17 0,31[0,15-0,79]	0,36 ± 0,18 0,34[0,14-0,81]	0,38 ± 0,18 0,34[0,15-0,80]	0,015	0,007	
HRT ^f	0,28 ± 0,11 0,21[0,17-0,52]	0,31 ± 0,11 0,30[0,17-0,54]	0,32 ± 0,13 0,28[0,17-0,58]	0,34 ± 0,16 0,27[0,17-0,64]	0,027	0,005	0,009
R_Lathosterin [µg/mg]							
Plazebo	1,04 ± 0,43 0,91[0,60-1,99]	1,00 ± 0,42 0,94[0,55-2,03]	0,99 ± 0,30 0,93[0,57-1,86]	1,02 ± 0,36 0,91[0,57-1,89]	0,529		
Rlx 60 ^f	0,95 ± 0,37 0,89[0,47-1,77]	1,04 ± 0,42 1,02[0,42-2,04]	1,12 ± 0,47 1,00[0,49-2,14]	1,20 ± 0,51 1,18[0,51-2,29]	0,004	0,109	
Rlx 150 ^f	1,11 ± 0,51 0,99[0,45-2,51]	1,38 ± 0,60 1,17[0,70-3,03]	1,38 ± 0,63 1,33[0,67-2,97]	1,48 ± 0,69 1,33[0,67-3,17]	0,001	< 0,001	
HRT ^f	0,96 ± 0,31 0,83[0,52-1,44]	1,22 ± 0,38 1,26[0,71-1,83]	1,18 ± 0,37 1,15[0,67-1,70]	1,24 ± 0,51 1,17[0,62-2,03]	0,006	0,001	< 0,001

Legende Tabelle 6

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 7 Serumkonzentrationen von Lanosterin und der Ratio Lanosterin zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert^d	p – Wert^e
Lanosterin [µg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	30,6 ± 7,80 30,4[18,6-48,5]	31,6 ± 10,31 27,4[22,0-65,3]	29,6 ± 5,64 27,9[23,7-40,8]	29,9 ± 5,93 29,2[21,1-42,6]	0,688		
Rlx 60^f	27,3 ± 5,82 25,6[17,5-42,3]	25,5 ± 5,49 25,4[16,3-40,4]	27,9 ± 8,41 25,9[18,5-47,4]	29,9 ± 13,4 26,0[18,4-73,9]	0,354	0,514	
Rlx 150^f	30,2 ± 10,5 30,8[18,5-51,3]	27,9 ± 6,93 28,0[18,9-41,8]	28,3 ± 9,03 26,2[17,9-49,1]	29,2 ± 9,17 29,1[18,6-45,0]	0,634	0,151	
HRT^f	29,7 ± 9,96 28,0[20,4-60,5]	27,0 ± 6,83 18,1[44,0]	26,8 ± 7,51 24,9[18,3-46,2]	29,3 ± 11,1 26,0[16,9-53,6]	0,758	0,118	0,636
R_Lanosterin [ng/mg]							
Plazebo	113 ± 21,5 111[77,1-151]	116 ± 28,8 112[86,3-192]	116 ± 21,5 116[76,9-159]	112 ± 22,5 105[83,2-146]	0,849		
Rlx 60^f	99,4 ± 18,0 98,4[69,6-136]	96,8 ± 18,8 95,4[65,6-135]	105 ± 30,3 105[57,7-194]	110 ± 43,9 96,1[59,9-229]	0,234	0,418	
Rlx 150^f	107 ± 32,2 104[56,2-170]	110 ± 20,6 107[78,1-148]	112 ± 34,0 99,1[74,5-189]	116 ± 33,5 131[59,2-166]	0,220	0,628	
HRT^f	103 ± 24,8 94,2[74,3-158]	104 ± 18,5 106[71,6-135]	101 ± 19,1 100[78,0-135]	107 ± 37,0 96,9[62,8-198]	0,603	0,232	0,492

Legende Tabelle 7

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 8 Serumkonzentrationen von Desmosterin und der Ratio Desmosterin zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert^d	p – Wert^e
Desmosterin [mg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	0,25 ± 0,08 0,24[0,13-0,46]	0,25 ± 0,07 0,25[0,15-0,39]	0,25 ± 0,08 0,23[0,14-0,50]	0,23 ± 0,07 0,22[0,15-0,43]	0,318		
Rlx 60^f	0,23 ± 0,07 0,22[0,14-0,39]	0,23 ± 0,07 0,22[0,13-0,34]	0,25 ± 0,09 0,23[0,14-0,41]	0,24 ± 0,07 0,22[0,12-0,39]	0,508	0,897	
Rlx 150^f	0,26 ± 0,06 0,28[0,16-0,37]	0,24 ± 0,06 0,22[0,13-0,38]	0,24 ± 0,05 0,24[0,16-0,32]	0,24 ± 0,07 0,25[0,14-0,41]	0,051	0,107	
HRT^f	0,23 ± 0,07 0,21[0,13-0,42]	0,22 ± 0,08 0,19[0,12-0,40]	0,22 ± 0,08 0,19[0,13-0,44]	0,24 ± 0,07 0,22[0,15-0,37]	0,668	0,780	0,554
R_Desmosterin [µg/mg]							
Plazebo	0,90 ± 0,21 0,90[0,57-1,37]	0,91 ± 0,18 0,87[0,64-1,23]	0,97 ± 0,23 0,96[0,65-1,55]	0,86 ± 0,20 0,80[0,61-1,26]	0,373		
Rlx 60^f	0,84 ± 0,19 0,85[0,54-1,12]	0,86 ± 0,19 0,80[0,59-1,34]	0,90 ± 0,22 0,93[0,51-1,30]	0,88 ± 0,21 0,88[0,48-1,47]	0,336	0,852	
Rlx 150^f	0,94 ± 0,23 0,94[0,59-1,41]	0,93 ± 0,19 0,93[0,62-1,37]	0,93 ± 0,15 0,94[0,69-1,18]	0,95 ± 0,23 0,93[0,58-1,52]	0,853	0,834	
HRT^f	0,78 ± 0,19 0,76[0,44-1,08]	0,82 ± 0,25 0,81[0,53-1,23]	0,82 ± 0,21 0,79[0,54-1,28]	0,86 ± 0,21 0,80[0,60-1,24]	0,211	0,766	1,000

Legende Tabelle 8

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 9 Serumkonzentrationen von Cholestanol und der Ratio Cholestanol zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert ^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert ^d	p – Wert ^e
Cholestanol [mg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	0,40 ± 0,12 0,38[0,19-0,63]	0,40 ± 0,10 0,41[0,20-0,60]	0,38 ± 0,10 0,36[0,18-0,57]	0,39 ± 0,12 0,40[0,24-0,63]	0,816		
Rlx 60 ^f	0,38 ± 0,13 0,35[0,16-0,70]	0,38 ± 0,13 0,36[0,20-0,70]	0,37 ± 0,14 0,35[0,16-0,74]	0,37 ± 0,13 0,38[0,14-0,66]	0,666	0,655	
Rlx 150 ^f	0,38 ± 0,15 0,36[0,17-0,69]	0,33 ± 0,09 0,33[0,19-0,50]	0,32 ± 0,10 0,31[0,15-0,51]	0,31 ± 0,11 0,27[0,17-0,54]	0,002	0,002	
HRT ^f	0,33 ± 0,06 0,32[0,23-0,45]	0,28 ± 0,06 0,28[0,19-0,42]	0,29 ± 0,06 0,27[0,20-0,44]	0,29 ± 0,10 0,27[0,15-0,52]	0,139	0,012	0,002
R_Cholestanol [µg/mg]							
Plazebo	1,49 ± 0,41 1,52[0,62-2,09]	1,50 ± 0,35 1,53[0,73-2,15]	1,47 ± 0,40 1,48[0,67-2,39]	1,48 ± 0,45 1,52[0,67-2,23]	0,912		
Rlx 60 ^f	1,36 ± 0,37 1,26[0,79-2,24]	1,43 ± 0,40 1,35[0,85-2,61]	1,37 ± 0,47 1,36[0,75-2,66]	1,35 ± 0,44 1,28[0,70-2,56]	0,849	0,564	
Rlx 150 ^f	1,34 ± 0,43 1,35[0,57-2,06]	1,32 ± 0,33 1,36[0,68-1,90]	1,26 ± 0,34 1,20[0,58-1,97]	1,22 ± 0,32 1,22[0,60-1,79]	0,036	0,073	
HRT ^f	1,17 ± 0,20 1,18[0,61-1,38]	1,10 ± 0,24 1,05[0,72-1,63]	1,10 ± 0,23 1,04[0,76-1,62]	1,05 ± 0,32 1,07[0,06-1,77]	0,176	0,021	0,034

Legende Tabelle 9

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 10 Serumkonzentrationen von 24S-OH-Chol und der Ratio 24S-OH-Chol zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert ^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert ^d	p – Wert ^e
24S-OH-Chol [ng/ml]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	101 ± 20,2 102[69,2-138]	99,9 ± 19,5 101[74,9-147]	94,2 ± 21,1 94,6[60,9-133]	92,7 ± 21,1 95,9[64,0-147]	0,023		
Rlx 60 ^f	95,3 ± 21,5 100[72,7-156]	96,6 ± 23,1 94,2[62,0-151]	98,1 ± 27,4 92,6[63,3-183,2]	96,3 ± 26,5 95,2[63,6-178,8]	0,690	0,110	
Rlx 150 ^f	106 ± 17,6 104,3[84,1-145,6]	109 ± 20,3 104,8[84,6-149,9]	102 ± 17,1 99,0[77,2-148]	94,2 ± 14,6 92,6[47,1-122]	0,011	0,886	
HRT ^f	103 ± 24,5 97,1[75,7-169]	98,3 ± 20,2 94,7[77,5-159]	95,6 ± 20,4 93,4[70,5-155]	91,7 ± 17,7 89,7[69,0-140]	0,018	0,694	0,449
R_24S-OH-Chol [µg/mg]							
Plazebo	37,2 ± 4,76 37,5[30,4-49,3]	37,0 ± 4,95 36,2[28,3-47,0]	36,3 ± 5,53 36,4[28,0-46,7]	34,2 ± 4,30 33,4[28,0-43,1]	< 0,001		
Rlx 60 ^f	34,7 ± 6,84 34,7[21,9-53,1]	36,5 ± 6,98 36,9[25,4-57,7]	36,5 ± 7,06 36,3[24,9-55,7]	35,1 ± 7,66 34,7[23,4-57,8]	0,604	0,019	
Rlx 150 ^f	37,7 ± 7,17 35,8[28,3-55,4]	43,3 ± 7,79 41,7[32,7-58,3]	40,0 ± 5,53 38,9[33,2-53,9]	37,5 ± 5,61 36,9[28,9-48,2]	0,811	0,002	
HRT ^f	35,9 ± 6,22 35,0[25,8-49,5]	38,1 ± 4,57 37,4[33,1-48,9]	36,1 ± 4,64 35,9[29,6-45,4]	33,6 ± 4,95 34,0[25,9-42,6]	0,167	0,073	0,015

Legende Tabelle 10

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 11 Serumkonzentrationen von 27-OH-Chol und der Ratio 27-OH-Chol zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert^d	p – Wert^e
27-OH-Chol [ng/ml]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	240 ± 66,1 217[153-403]	241 ± 62,7 224[145-357]	227 ± 59,4 220[147-386]	234 ± 65,6 221[138-367]	0,505		
Rlx 60^f	227 ± 44,8 232[135-298]	216 ± 52,5 214[119-332]	225 ± 60,5 213[140-384]	217 ± 45,6 223[126-335]	0,132	0,957	
Rlx 150^f	257 ± 61,7 253[135-368]	246 ± 62,7 236[152-378]	238 ± 47,1 249[158-315]	214 ± 35,0 219[158-269]	0,003	0,072	
HRT^f	236 ± 81,5 217[152-477]	224 ± 57,7 212[169-397]	227 ± 63,6 219[146-407]	229 ± 63,1 206[175-393]	0,376	0,926	0,432
R_ 27-OH-Chol [µg/mg]							
Plazebo	89,1 ± 21,3 85,3[58,2-123]	89,6 ± 21,0 85,8[57,4-134]	88,7 ± 21,6 89,8[60,7-133]	87,2 ± 20,7 88,1[54,4-117]	0,185		
Rlx 60^f	82,5 ± 15,3 75,6[64,7-114]	81,6 ± 17,0 81,2[58,6-114]	84,3 ± 18,5 78,6[63,0-138]	79,9 ± 17,4 75,9[57,8-132]	0,260	0,883	
Rlx 150^f	90,8 ± 18,4 89,2[46,4-122]	97,97,± 25,7 102[54,5-152]	93,9 ± 17,6 93,1[62,2-122]	85,1 ± 14,0 89,6[57,6-103]	0,092	0,958	
HRT^f	82,2 ± 21,5 75,5[61,6-133]	86,5 ± 13,8 84,4[71,3-122]	84,9 ± 13,7 83,4[69,3-119]	83,0 ± 15,6 80,8[65,0-119]	0,978	0,546	0,457

Legende Tabelle 11

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 12 Serumkonzentrationen von Campesterin und der Ratio Campesterin zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert ^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert ^d	p – Wert ^e
Campesterin [mg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	0,51 ± 0,18 0,45[0,28-0,93]	0,56 ± 0,18 0,53[0,32-1,00]	0,54 ± 0,21 0,47[0,20-1,01]	0,58 ± 0,19 0,57[0,28-0,93]	0,077		
Rlx 60 ^f	0,50 ± 0,24 0,46[0,19-1,11]	0,53 ± 0,24 0,46[0,26-1,07]	0,52 ± 0,24 0,50[0,21-1,18]	0,54 ± 0,26 0,52[0,10-1,13]	0,056	0,347	
Rlx 150 ^f	0,48 ± 0,27 0,42[0,09-1,26]	0,41 ± 0,19 0,42[0,16-0,87]	0,43 ± 0,26 0,38[0,10-1,13]	0,42 ± 0,19 0,40[0,51-0,86]	0,066	0,012	
HRT ^f	0,51 ± 0,20 0,47[0,24-0,93]	0,40 ± 0,20 0,39[0,17-0,86]	0,41 ± 0,18 0,40[0,21-0,87]	0,45 ± 0,22 0,39[0,24-1,05]	0,028	0,004	< 0,001
R_Campesterin [µg/mg]							
Plazebo	1,94 ± 0,77 1,86[0,87-3,56]	2,12 ± 0,76 1,91[1,12-3,37]	2,11 ± 0,81 1,91[0,88-3,87]	2,20 ± 0,74 2,09[0,92-3,51]	0,086		
Rlx 60 ^f	1,77 ± 0,73 1,51[0,79-3,54]	1,97 ± 0,86 1,84[1,14-4,02]	1,94 ± 0,82 1,63[0,97-4,23]	1,96 ± 0,94 1,78[0,54-4,43]	0,074	0,618	
Rlx 150 ^f	1,66 ± 0,81 1,55[0,30-3,76]	1,61 ± 0,73 1,53[0,56-3,15]	1,68 ± 0,95 1,56[0,39-3,58]	1,66 ± 0,78 1,53[0,54-3,17]	0,976	0,205	
HRT ^f	1,76 ± 0,70 1,61[1,02-3,56]	1,56 ± 0,77 1,53[0,74-3,40]	1,56 ± 0,62 1,40[0,81-3,22]	1,63 ± 0,71 1,55[0,95-3,53]	0,031	0,009	0,015

Legende Tabelle 12

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

Tabelle 13 Serumkonzentrationen von Sitosterin und der Ratio Sitosterin zu Cholesterin über den 24-monatigen Studienverlauf

	Basiswert ^a	6 Monate	12 Monate	24 Monate	p-Wert	p – Wert ^d	p – Wert ^e
Sitosterin [mg/dl]	MW ± SD ^b Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	MW ± SD Median [Min-Max]	Basiswert/ 24 Monate	ANCOVA einzelne Gruppen	ANCOVA alle Gruppen
Plazebo	0,45 ± 0,16 0,47[0,23-0,84]	0,48 ± 0,15 0,51[0,26-0,70]	0,46 ± 0,17 0,40[0,24-0,80]	0,48 ± 0,16 0,40[0,19-0,71]	0,153		
Rlx 60 ^f	0,45 ± 0,19 0,40[0,17-0,91]	0,46 ± 0,20 0,38[0,24-0,96]	0,45 ± 0,19 0,40[0,18-1,00]	0,46 ± 0,22 0,42[0,13-0,97]	0,508	0,612	
Rlx 150 ^f	0,40 ± 0,20 0,38[0,14-1,01]	0,36 ± 0,16 0,37[0,15-0,79]	0,35 ± 0,18 0,29[0,16-0,84]	0,35 ± 0,15 0,33[0,15-0,71]	0,039	0,010	
HRT ^f	0,41 ± 0,12 0,39[0,29-0,68]	0,33 ± 0,12 0,33[0,19-0,55]	0,34 ± 0,10 0,32[0,19-0,58]	0,37 ± 0,12 0,35[0,25-0,70]	0,068	0,005	0,003
R_Sitosterin [µg/mg]							
Plazebo	1,72 ± 0,66 1,77[0,62-3,21]	1,82 ± 0,65 1,69[0,88-3,07]	1,80 ± 0,66 1,71[0,80-3,10]	1,84 ± 0,66 1,70[0,65-3,22]	0,160		
Rlx 60 ^f	1,59 ± 0,55 1,44[0,74-2,90]	1,73 ± 0,70 1,53[0,96-3,61]	1,68 ± 0,62 1,46[0,83-3,39]	1,68 ± 0,79 1,51[0,70-3,40]	0,378	0,924	
Rlx 150 ^f	1,42 ± 0,63 1,26[0,47-3,01]	1,43 ± 0,62 1,29[0,56-2,84]	1,38 ± 0,71 1,12[0,47-2,78]	1,43 ± 0,72 1,18[0,55-3,28]	0,867	0,343	
HRT ^f	1,46 ± 0,40 1,36[0,89-2,43]	1,28 ± 0,45 1,23[0,62-2,17]	1,30 ± 0,38 1,24[0,73-2,17]	1,38 ± 0,41 1,31[0,76-2,38]	0,231	0,022	0,094

Legende Tabelle 13

- ^a Einfaktorielle ANOVA zum Vergleich der Unterschiede der Basiswerte zwischen den Gruppen ohne signifikanten Unterschied
- ^b MW ± SD: Mittelwert ± Standardabweichung
- ^c Zweiseitiger gepaarter T-Test zwischen Basiswerten und Werten nach 24 Monaten
- ^d ANCOVA einzelne Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen der jeweiligen Therapiegruppe im Zeitverlauf gegen Plazebo mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^e ANCOVA alle Gruppen: Varianzanalyse für wiederholte Messungen für Unterschiede zwischen allen Therapiegruppen im Zeitverlauf mit den Basiswerten, Östradiol-Serumkonzentrationen, Raucherstatus und Differenz des BMI als konstante Kovariaten
- ^f Rlx 60: Raloxifen 60 mg/Tag; Rlx 150: Raloxifen 150 mg/Tag; HRT: Hormonersatztherapie (konjug. Östrogene/Medroxyprogesteronacetat)

4. DISKUSSION

In dieser Studie untersuchten wir an gesunden frühmenopausalen Frauen den Einfluß von Raloxifen und Hormonersatztherapie auf endogene Marker des Cholesterinmetabolismus, die Cholesterinvorstufen Lathosterin, Desmosterin und Lanosterin und die Abbauprodukte Cholestanol, 24S-Hydroxycholesterin, einen spezifischen Marker des Hirn-Cholesterinmetabolismus, sowie das ubiquitäre 27-Hydroxycholesterin. Unseres Wissens nach ist dies die erste randomisierte plazebo-kontrollierte Studie, die Effekte von Raloxifen oder HRT auf 24S-Hydroxycholesterin und andere Surrogatmarker des Cholesterinmetabolismus untersucht. Außerdem wurden die Konzentrationen der pflanzlichen Sterine Campesterin und Sitosterin im Plasma bestimmt, um Änderungen des Resorptionsverhaltens von mit der Nahrung zugeführten Sterinen unter der Studienmedikation feststellen zu können.

Während die Serumkonzentrationen von Cholesterin unter der Behandlung mit 150 mg Raloxifen signifikant abfielen, blieben sie in den Sera der anderen Gruppen unverändert. Die Ratio von Lathosterin zu Cholesterin, einem Marker der endogenen Ganzkörpercholesterinsynthese, stieg sowohl in den beiden Raloxifen- als auch in der HRT Behandlungsgruppe. Unser Befund, dass Raloxifen nur in hoher Dosierung einen Einfluss zeigt, wird durch andere Studien unterstützt, die ebenfalls einen dosisabhängigen Effekt auf den Cholesterinmetabolismus nachwiesen (Agnusdei et al., 1999). Parallel zur Senkung des Cholesterins wurde ebenso die Konzentration seines 5 α -gesättigten Abbauproduktes, Cholestanol, unter Rlx 150 signifikant gesenkt. Über die Bedeutung dieses Abbauproduktes gibt es bisher keine eindeutigen Erkenntnisse.

In früheren Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen SERM wie Raloxifen oder Tamoxifen und Cholesterinmetabolismus sind nur Untersuchungen von Tamoxifen, einem SERM der ersten Generation, bekannt. Tamoxifen blockiert die Wirkung von Östrogen durch Bindung am Östrogenrezeptor, inhibiert die Konversion von Delta 8-Cholestenol zu Lathosterin in der Cholesterinbiosynthese und inhibiert außerdem die Delta 24,25 Reduktion, was letztlich zur Akkumulation von drei Sterolvorstufen des Cholesterins führt: Zymosterin, Desmosterin und Delta-8-Cholestenol (Gylling et al., 1995). Folglich werden die Plasmagesamtcholesterin- und LDL-Cholesterin- Spiegel vermutlich durch Herabregulierung der Cholesterinsynthese gesenkt (Holleran et al., 1998). Raloxifen kann lediglich einen Teil der Östrogen regulierten Gene aktivieren und der SERM-Östrogen- Rezeptor-Komplex bindet nicht am estrogen-response-element, sondern am raloxifene-response-element.

Raloxifen bedeutet gegenüber Tamoxifen eine signifikante Verbesserung in der Prävention der Endometriumhyperplasie. Weiterhin reduziert es die Inzidenz von Wirbelfrakturen bei osteoporotischen Patienten und von neu auftretendem Brustkrebs (Cummings et al., 1999; Ettinger et al., 1999). In Multizenterstudien mit frühmenopausalen Frauen, die entweder 30, 60, oder 150 mg Raloxifen oder Plazebo erhielten, fielen dosisabhängig sowohl die Konzentrationen des Gesamtplasmacholesterins als auch des LDL-Cholesterins signifikant in allen mit Raloxifen behandelten Gruppen ab (Agnusdei et al., 1999; De Leo et al., 2001). Am gleichen Patientenkollektiv, welches an unserer Untersuchung teilnahm, konnte unter Raloxifen eine signifikante Senkung des Lipoproteins(a) (Lp(a)), eines biochemischen Markers für das kardiovaskuläre Risiko, beobachtet werden (Smolders et al., 2002). In der 3-4 jährigen MORE Studie war das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nicht generell, wohl aber in der Subgruppe mit dem höchsten Risiko gesenkt (Barrett-Connor et al., 2002). Erst kürzlich wurde in einer Neuevaluierung (5.386 postmenopausale Frauen) der Ergebnisse aus der MORE-Studie (Yaffe et al., 2005) gefunden, dass unter 120 mg Raloxifen nicht aber unter 60 mg Raloxifen das relative Risiko einer kognitiven Verschlechterung um 33% verringert war. Für die Alzheimer Krankheit betrug die Rate 0.52% relatives Risiko.

Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig einen Anstieg der Cholesterinsynthese, nachgewiesen durch einen Anstieg der Serumkonzentrationen des Lathosterins und seiner Ratio zu Cholesterin, und folglich kann der Cholesterin senkende Effekt von Raloxifen nicht durch dieselben Mechanismen, wie sie für Tamoxifen beschrieben wurden, erklärt werden. Dies muß in weiteren *in vivo* Experimenten, unter Nutzung analoger Techniken wie der Isotopomerspektalanalysen, geprüft werden (Holleran et al., 1998). HRT führt ebenfalls zu einem Anstieg der absoluten Lathosterinkonzentration und seiner Ratio zu Cholesterin, beeinflusst jedoch auch die Marker der Cholesterinabsorption im Serum, belegt durch den Abfall der Ratio von Campesterin zu Cholesterin. Der Abfall von Campesterin während der Einnahme von 150 mg Raloxifen war signifikant, nicht aber die Ratio zu Cholesterin. Es ist bekannt, dass einer Reduktion der Cholesterinabsorptionsrate durch Erhöhung der endogenen Cholesterinsynthese in der Leber entgegengewirkt wird. Die Gabe von Ezetimibe, einem neuartigen Cholesterinabsorptionshemmer in einer Dosis von 10 mg pro Tag führt bei hypercholesterinämischen Patienten zu einem signifikanten Anstieg der Cholesterinsynthese, bewiesen sowohl durch die fecal balance Methode als auch durch einen Abfall der Ratio Lathosterin zu Cholesterin im Plasma der behandelten Patienten (Sudhop et al., 2002).

Obwohl in unserer Studie insgesamt das Cholesterin während der Behandlung mit 150 mg Raloxifen gesenkt wurde, könnte der Anstieg der Ratio Lathosterin zu Cholesterin

nachteilige, durch Konversion des neusynthetisierten Cholesterins in Oxidationsprodukte, atherosklerosebegünstigende Effekte erzielen, oder könnte über eine Erhöhung der Cholesterinsyntheserate in Neuronen oder Gliazellen die Prozessierung von Amyloid Precursor Protein (APP) im Hirn verstärken und so letztendlich die Pathogenese des M. Alzheimer fördern. Daher wird neuerdings Ezetimibe (10mg) mit einem Statin kombiniert (Davidson et al., 2004; Davidson et al., 2002).

Neue epidemiologische Studien lassen vermuten, daß Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl- CoA- Reduktase, die so genannten Statine, die Prävalenz der Alzheimer Erkrankung senken. Es ist nicht bekannt, ob dieser Effekt der Statine auf lokaler Inhibition der Cholesterinsynthese im Hirn oder auf einer bisher nicht bekannten Wechselwirkung zwischen zentralem und peripherem System nach Senkung der Cholesterinspiegel im Serum beruht (Jick et al., 2000; Rockwood et al., 2002; Wolozin et al., 2000; Yaffe et al., 2002). Der mögliche lokale Effekt von Statinen auf den menschlichen Hirn- Cholesterinmetabolismus bei nicht dementen hypercholesterinämischen und dementen Patienten mit und ohne Hypercholesterinämie wurde durch erniedrigte Konzentrationen von Lathosterin und 24S-Hydroxycholesterin im Liquor cerebrospinalis und durch Verminderung der Plasmakonzentrationen von 24S-Hydroxycholesterin und seiner Ratio zu Cholesterin beschrieben (Fassbender et al., 2002; Locatelli et al., 2002; Simons et al., 2002; Vega et al., 2003).

Sowohl unter Rlx 150 als auch unter HRT zeigte sich im Vergleich der Serumkonzentrationen an 24S-Hydroxycholesterin im Verlauf der zweijährigen Studiendauer ein signifikanter Abfall, der jedoch durch eine Senkung des Absolutgehaltes an 24S-Hydroxycholesterin in der Placebogruppe aufgehoben wird. Diesen Effekt können wir uns bisher nicht erklären. Es gilt aber als gesichert, dass die seitenketten-oxidierten Cholesterinmetabolite, das 24S-Hydroxycholesterin und das 27-Hydroxycholesterin, ausschließlich enzymatisch gebildet werden und nicht über mögliche Autoxidation durch längere, nicht fachgerechte Asservierung entstehen können (Leoni et al., 2005). Die Oxysterole 24S-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin werden in den verschiedenen Lipoproteinen proportional zum Cholesterin selbst transportiert (Babiker und Diczfalusy, 1998). Daraus resultiert eine sehr hohe Korrelation zwischen den oben genannten Serumkonzentrationen von seitenketten-oxidierten Sterolen und deren Ausgangsverbindung, dem Cholesterin (Björkhem et al., 1998). Die daher herangezogene Ratio von 24S-Hydroxycholesterin zu Cholesterin lässt erkennen, dass es in den Therapiegruppen im Verlauf keine signifikanten Unterschiede gibt, die Ratio in der Placebogruppe lediglich durch die unveränderte Cholesterinkonzentration signifikant wurde.

Insofern konnten wir in dieser Untersuchung keinen reduzierenden Effekt von Raloxifen oder HRT auf die Produktion oder Sekretion von 24S-Hydroxycholesterin finden.

Es ist zum jetzigen Zeitpunkt mit den von uns durchgeführten Annäherungen zum Cholesterinmetabolismus schwierig, über die Serumparameter eindeutige Rückschlüsse auf den lokalen Cholesterinmetabolismus, insbesondere im Gehirn, führen zu können. Änderungen im Lathosterin bzw. der Ratio Lathosterin zu Cholesterin im Serum zeigen uns hauptsächlich Veränderungen der HMG-CoA Reduktaseaktivität in der Leber an, während Serumspiegeländerungen von 24S-Hydroxycholesterin auf mögliche Änderungen im Hirncholesterinmetabolismus hindeuten könnten. Falls jedoch der Cholesterinmetabolismus im Gehirn durch Medikamente beeinflusst werden soll, so setzt dies voraus, dass diese Substanzen auch die Bluthirnschranke überwinden können und dort lokal wirken. Für Statine wird dies sehr kontrovers diskutiert und bisher gilt die Annahme, dass nur die lipophilen Statine wie Simvastatin, Lovastatin und Atorvastatin die Bluthirnschranke überwinden können (Crisby et al., 2002). Selbst für Cholesterin stellt diese Barriere ein deutliches Hindernis dar und nur weniger als 1% des im Gehirn vorhandenen Cholesterin stammt aus der Peripherie (Dietschy und Turley, 2004).

Der Erfolg vieler Wirkstoffkombinationen in der Hypertoniebehandlung hat auch das Interesse an Kombinationen von Wirkstoffen in der Lipid- und Atherosklerosebehandlung verstärkt. Es gab Versuche Statinbehandlung mit Östrogen-, Raloxifen- oder Östrogen/Gestagen- Hormonersatztherapie zu vergleichen oder zu kombinieren. Eine duale Therapie mit Raloxifen oder HRT und einem Statin könnte somit, neben einem stärker antiatherogenen Effekt, der bei der Therapie mit Raloxifen oder HRT auftretenden Erhöhung der endogenen Cholesterinbiosynthese entgegenwirken. *In vitro* Studien zeigten, daß die Kombination von einem Östrogen mit einem Statin günstige Effekte auf die Gefäße ausübt (Mueck et al., 2001). Die biochemischen Marker veränderten sich hin zu einer verbesserten Endothelfunktion (Mueck et al., 2001). Daher kann mit der gleichzeitigen Anwendung eines Statins und einer oralen Östrogens/Progesteron Kombination bei postmenopausalen Frauen mit Hypercholesterämie ein stärker kardioprotektives Lipoproteinprofil als mit jeder der beiden Therapien allein erreicht werden (Darling et al., 1999).

Etwa 10% der Personen, die älter als 65 Jahre sind, und fast 50% derer, die älter als 85 Jahre sind haben eine Demenz (Hogervorst et al., 2002). Das Alter unserer Probanden reichte von 47 bis 60 Jahre. Dies könnte vielleicht erklären, warum die Effekte der verschiedenen Therapiestrategien auf die Hirn-Marker nicht so deutlich sind, da die Frauen sich noch in einer Präphase befinden. Jedoch sollte eine mögliche, in die Pathogenese der Alzheimer

Demenz eingreifende Behandlungsstrategie so früh wie möglich eingeleitet werden, gerade bevor sich die zur Alzheimer Demenz führenden pathogenetischen Mechanismen verstärken. Zusammenfassend zeigte der Vergleich von Langzeiteffekten zweier verschiedener Dosierungen von Raloxifen mit oraler Hormonersatztherapie auf Surrogatmarker des Cholesterinmetabolismus, dass der Cholesterinmetabolismus des Hirnes nicht beeinflusst zu werden scheint, während die Ratio Lathosterin zu Cholesterin, ein indirekter Marker der Ganzkörpercholesterinsynthese, unter den verschiedenen Behandlungsstrategien anstieg. Wir können bestätigen, daß Behandlung mit 150 mg Raloxifen die Serumkonzentration des Gesamtcholesterin erniedrigt. Weitere Untersuchungen sollten versuchen zu klären, über welche Mechanismen Raloxifen in einer Dosierung von 150 mg/Tag das Gesamtcholesterin bei gleichzeitigem Anstieg der Synthesmarker senkt. Die Erhöhung der Cholesterinsynthese könnte außerdem durch zweckmäßige Kombination von Raloxifen oder HRT mit einem Statin vermieden werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurde der Einfluß von Raloxifen und Hormonersatztherapie auf endogene Serummarker des Cholesterinmetabolismus, insbesondere auf einen Surrogatmarker des zerebralen Cholesterinstoffwechsels, das 24S-Hydroxycholesterin, untersucht.

In einer randomisierten, doppelblind-plazebokontrollierten Untersuchung erhielten 95 nicht hysterektomierte, frühpostmenopausale Frauen entweder Plazebo, 60 mg Raloxifen, 150 mg Raloxifen oder eine Hormonersatztherapie mit 0,625 mg konjugierten equinen Östrogenen kombiniert mit 2,5 mg Medroxyprogesteronacetat. Nüchternblutproben wurden unmittelbar vor Studienbeginn als Basismessung sowie im Studienverlauf nach 6, 12 und 24 Monaten zur Analyse entnommen. Bestimmt wurden neben dem Gesamtcholesterin die Cholesterinvorstufen Lathosterin, Lanosterin und Desmosterin, die Abbauprodukte Cholestanol, 24S- und 27-Hydroxycholesterin, sowie die pflanzlichen Sterine Campesterin und Sitosterin mittels hochsensitiver und -selektiver Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Die Analyse erfolgte retrospektiv an Serumproben, die bei -70°C asserviert waren. Die Daten von 71 Frauen konnten letztlich ausgewertet werden (Plazebo: n = 20, Raloxifen 60mg: n = 21, Raloxifen 150 mg: n = 16 und Hormonersatztherapie: n = 14).

Nach zweijähriger Behandlung waren unter 150 mg Raloxifen die Serumcholesterinkonzentrationen signifikant um 10% ($p = 0,002$) gesenkt. Die Ratio von Lathosterin zu Cholesterin, einem Surrogatmarker für die endogene Gesamtkörpercholesterinsynthese, stieg in allen Therapiegruppen signifikant an. In der Raloxifen 60 mg Therapiegruppe zeigte sich allerdings in der Varianzanalyse im Vergleich zur Plazebogruppe kein signifikanter Unterschied. In der Raloxifen 150 mg und der Hormonersatztherapiegruppe ergab sich im Verlauf ein signifikanter Abfall des 24S-Hydroxycholesterins. Durch gleichgerichtete Änderungen in der Plazebogruppe bestand jedoch in der Varianzanalyse keine Signifikanz mehr. Die Ratio von Campesterin und Sitosterin zu Cholesterin, Surrogatmarker der Resorptionsrate exogener Sterine, wurde nur unter Hormonersatztherapie signifikant gesenkt.

Eine Senkung des Gesamtcholesterins unter hochdosiertem Raloxifen und Hormonersatztherapie konnte bestätigt werden. Durch Bestimmung des indirekten Markers, 24S-Hydroxycholesterin, konnte kein Einfluss von Raloxifen bzw. Hormonersatztherapie auf den Cholesterinmetabolismus im zentralen Nervensystem gefunden werden. Die Resorptionsrate von Cholesterin wurde unter Hormonersatztherapie gesenkt. Die endogene Cholesterinsynthese jedoch, indiziert durch die Ratio von Lathosterin zu Cholesterin, wurde

in allen Therapiegruppen deutlich gesteigert. Dieser Befund könnte eine Kombinationstherapie mit Cholesterinsynthesehemmern (Statinen) notwendig erscheinen lassen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott RD, Garrison RJ, Wilson PW. Framingham Heart Study data on females using estrogen supplements. *Arteriosclerosis* 1984;4:517

Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* 1990;10:1051-1057

Agnusdei D, Liu-Leage S, Augendre-Ferrante B. Results of international clinical trials with raloxifene. *Ann Endocrinol* 1999;60:242-246

Amaducci LA, Fratiglioni L, Rocca WA, Fieschi C, Livrea P, Pedone D, Bracco L, Lippi A, Gandolfo C, Bino G. Risk factors for clinically diagnosed Alzheimer's disease: a case-control study of an Italian population. *Neurology* 1986;36:922-931

Anderson JN, Peck EJ, Jr., Clark JH. Estrogen-induced uterine responses and growth: relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinology* 1975;96:160-167

Andersson S, Davis DL, Dahlback H, Jornvall H, Russell DW. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem* 1989;264:8222-8229

Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl:11-20

Babiker A, Diczfalusy U. Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1392:333-339

Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 1998;19:55-72

Berge KE, von Bergmann K, Lütjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2002;43:486-494

Binder EF, Schechtman KB, Birge SJ, Williams DB, Kohrt WM. Effects of hormone replacement therapy on cognitive performance in elderly women. *Maturitas* 2001;38:137-146

Birge SJ. Soy phytoestrogens: an adjunct to hormone replacement therapy? *Menopause* 2000;7:209-212

Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 1998;39:1594-1600

Björkhem I, Miettinen T, Reihner E, Ewerth S, Angelin B, Einarsson K. Correlation between serum levels of some cholesterol precursors and activity of HMG-CoA reductase in human liver. *J Lipid Res* 1987;28:1137-1143

Björkhem I, Starck L, Andersson U, Lütjohann D, von Bahr S, Pikuleva I, Babiker A, Diczfalusy U. Oxysterols in the circulation of patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome: abnormal levels of 24S- and 27-hydroxycholesterol. *J Lipid Res* 2001;42:366-371

Bloch K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* 1992;57:378-383

Brenner DE, Kukull WA, Stergachis A, van Belle G, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Larson EB. Postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of Alzheimer's disease: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol* 1994;140:262-267

Bretillon L, Lütjohann D, Stahle L, Widhe T, Bindl L, Eggertsen G, Diczfalusy U, Björkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J Lipid Res* 2000a;41:840-845

Bretillon L, Siden A, Wahlund LO, Lütjohann D, Minthon L, Crisby M, Hillert J, Groth CG, Diczfalusy U, Björkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett* 2000b;293:87-90

Broe GA, Henderson AS, Creasey H, McCusker E, Korten AE, Jorm AF, Longley W, Anthony JC. A case-control study of Alzheimer's disease in Australia. *Neurology* 1990;40:1698-1707

Buddecke E. *Molekulare Medizin*. Münster: ecomed, 2002

Caldwell BM, Watson RI. An evaluation of psychologic effects of sex hormone administration in aged women. I. Results of therapy after six months. *J Gerontol* 1952;7:228-244

Cali JJ, Russell DW. Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem* 1991;266:7774-7778

Campbell S, Whitehead M. Oestrogen therapy and the menopausal syndrome. *Clin Obstet Gynaecol* 1977;4:31-47

Cancer CGoHFiB. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1997;350:1047-1059

Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, Farrerons J, Karasik A, Mellstrom D, Ng KW, Stepan JJ, Powles TJ, Morrow M, Costa A, Silfen SL, Walls EL, Schmitt H, Muchmore DB, Jordan VC, Ste-Marie LG. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat* 2001;65:125-134

Cholerton B, Gleason CE, Baker LD, Asthana S. Estrogen and Alzheimer's disease: the story so far. *Drugs Aging* 2002;19:405-427

Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1987;316:1105-1110

Crisby M, Carlson LA, Winblad B. Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2002;16:131-136

Crosignani PG, Kenemans P, Paoletti R, Soma MR, Woodford FP. Hormone replacement and the menopause: a European position paper. Writing Group on Women's Health of the Fondazione Giovanni Lorenzini Medical Science Foundation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;74:67-72

Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC. The

effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. JAMA 1999;281:2189-2197

Darling GM, Johns JA, McCloud PI, Davis SR. Concurrent use of simvastatin and estrogen-progestin therapy compared with each therapy alone for hypercholesterinemia in postmenopausal woman. Climacteric 1999;181-188

Davidson MH, Ballantyne CM, Kerzner B, Melani L, Sager PT, Lipka L, Strony J, Suresh R, Veltri E. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with statins: randomised, placebo-controlled, blinded experience in 2382 patients with primary hypercholesterolemia. Int J Clin Pract 2004;58:746-755

Davidson MH, McGarry T, Bettis R, Melani L, Lipka LJ, LeBeaut AP, Suresh R, Sun S, Veltri EP. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. J Am Coll Cardiol 2002;40:2125-2134

de Chaves EI, Rusinol AE, Vance DE, Campenot RB, Vance JE. Role of lipoproteins in the delivery of lipids to axons during axonal regeneration. J Biol Chem 1997;272:30766-30773

De Leo V, la Marca A, Morgante G, Lanzetta D, Setacci C, Petraglia F. Randomized control study of the effects of raloxifene on serum lipids and homocysteine in older women. Am J Obstet Gynecol 2001;184:350-353

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol 2001;12:105-112

Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. J Lipid Res 2004;45:1375-1397

Ditkoff EC, Crary WG, Cristo M, Lobo RA. Estrogen improves psychological function in asymptomatic postmenopausal women. Obstet Gynecol 1991;78:991-995

Doran PM, Riggs BL, Atkinson EJ, Khosla S. Effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on bone turnover markers and serum sex steroid and lipid levels in elderly men. J Bone Miner Res 2001;16:2118-2125

Duka T, Tasker R, McGowan JF. The effects of 3-week estrogen hormone replacement on cognition in elderly healthy females. Psychopharmacology (Berl) 2000;149:129-139

Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995;225:73-80

Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 1999;282:637-645

Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, Ragoschke A, Kuehl S, Walter S, Walter J, Brechtel K, Muehlhauser F, Von Bergmann K, Lütjohann D. Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 2002;59:1257-1258

Fedor-Freybergh P. The influence of oestrogens on the wellbeing and mental performance in climacteric and postmenopausal women. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1977;64:1-91

Fieser LF, Fieser M. *Steroide*. Verlag Chemie, 1961

Fillit H, Weinreb H, Cholst I, Luine V, McEwen B, Amador R, Zabriskie J. Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type. *Psychoneuroendocrinology* 1986;11:337-345

Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1371-1388

Gengo F, Cwudzinski D, Kinkel P, Block G, Stauffer L, Lines C. Effects of treatment with lovastatin and pravastatin on daytime cognitive performance. *Clin Cardiol* 1995;18:209-214

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430

Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. Cardiovascular disease

outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002;288:49-57

Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, Cummings SR. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992;117:1016-1037

Graves AB, White E, Koepsell TD, Reifler BV, van Belle G, Larson EB, Raskind M. A case-control study of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1990;28:766-774

Griewing B, Romer T, Spitzer C, Ludemann J, Gunther A, Kessler C. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: carotid intima-media thickness and 3-D volumetric plaque quantification. *Maturitas* 1999;32:33-40

Grodstein F, Chen J, Pollen DA, Albert MS, Wilson RS, Folstein MF, Evans DA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and cognitive function in healthy older women. *J Am Geriatr Soc* 2000a;48:746-752

Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2000b;133:933-941

Groen AK, Bloks VW, Bandsma RH, Ottenhoff R, Chimini G, Kuipers F. Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL. *J Clin Invest* 2001;108:843-850

Groen AK, Oude Elferink RP, Verkade HJ, Kuipers F. The ins and outs of reverse cholesterol transport. *Ann Med* 2004;36:135-145

Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA. Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am Heart J* 1988;115:954-963

Grundey SM. Cholesterol and coronary heart disease. A new era. *JAMA* 1986;256:2849-2858

Gylling H, Pyrhonen S, Mantyla E, Maenpaa H, Kangas L, Miettinen TA. Tamoxifen and toremifene lower serum cholesterol by inhibition of delta 8-cholesterol conversion to lathosterol in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 1995;13:2900-2905

Hackman BW, Galbraith D. Replacement therapy and piperazine oestrone sulphate ('Harmogen') and its effect on memory. *Curr Med Res Opin* 1976;4:303-306

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;140:5566-5578

Harrison RW, Ashton CH. Do cholesterol-lowering agents affect brain activity? A comparison of simvastatin, pravastatin, and placebo in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1994;37:231-236

Henderson VW, Paganini-Hill A, Emanuel CK, Dunn ME, Buckwalter JG. Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Arch Neurol* 1994;51:896-900

Henderson VW, Paganini-Hill A, Miller BL, Elble RJ, Reyes PF, Shoupe D, McCleary CA, Klein RA, Hake AM, Farlow MR. Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 2000;54:295-301

Heringa M. Review on raloxifene: profile of a selective estrogen receptor modulator. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003;41:331-345

Hernandez E, Valera R, Alonzo E, Bajares-Lilue M, Carlini R, Capriles F, Martinis R, Bellorin-Font E, Weisinger JR. Effects of raloxifene on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal women on chronic hemodialysis. *Kidney Int* 2003;63:2269-2274

Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, Waters D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:522-529

Heyman A, Wilkinson WE, Stafford JA, Helms MJ, Sigmon AH, Weinberg T. Alzheimer's disease: a study of epidemiological aspects. *Ann Neurol* 1984;15:335-341

Hogervorst E, Yaffe K, Richards M, Huppert F. Hormone replacement therapy to maintain cognitive function in women with dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;3:3799

Holdenrieder S, Lütjohann D, Geiger S, Von Bergmann K, Stieber P, Hamann GF. Does brain specific 24S-hydroxycholesterol in plasma indicate the disruption of the blood-brain barrier in patients with ischemic stroke? *Neurosci Lett* 2004;368:201-204

Holleran AL, Lindenthal B, Aldaghlis TA, Kelleher JK. Effect of tamoxifen on cholesterol synthesis in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Metabolism* 1998;47:1504-1513

Honjo H, Ogino Y, Naitoh K, Urabe M, Kitawaki J, Yasuda J, Yamamoto T, Ishihara S, Okada H, Yonezawa T. In vivo effects by estrone sulfate on the central nervous system-senile dementia (Alzheimer's type). *J Steroid Biochem* 1989;34:521-525

Hübschmann HJ. *Handbuch der GC-MS. Grundlagen und Anwendungen*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1996

Jacobs DM, Tang MX, Stern Y, Sano M, Marder K, Bell KL, Schofield P, Dooneief G, Gurland B, Mayeux R. Cognitive function in nondemented older women who took estrogen after menopause. *Neurology* 1998;50:368-373

Janowsky JS, Chavez B, Orwoll E. Sex steroids modify working memory. *J Cogn Neurosci* 2000;12:407-414

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* 1991;104:1033-1037

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000;356:1627-1631

Jordan VC, Glusman JE, Eckert S. Raloxifene reduces incident primary breast cancers: Integrated data from multicenter double blind placebo controlled randomized trials in postmenopausal women. *Breast Cancer Res Treat* 1998;50:227

Kannel WB, Wilson PW. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med* 1995;155:57-61

Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E. A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* 1997;48:1517-1521

Kempen HJ, Glatz JF, Gevers Leuven JA, van der Voort HA, Katan MB. Serum lathosterol concentration is an indicator of whole-body cholesterol synthesis in humans. *J Lipid Res* 1988;29:1149-1155

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj* 2001;322:1447-1451

Kölsch H, Heun R, Kerksiek A, Bergmann Kv K, Maier W, Lütjohann D. Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients. *Neurosci Lett* 2004;368:303-308

Kölsch H, Lütjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptok U, Jessen F, von Bergmann K, Rao ML, Maier W, Heun R. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2002;7:899-902

Kölsch H, Lütjohann D, von Bergmann K, Heun R. The role of 24S-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 2003;7:37-41

Kölsch H, Rao ML. Neuroprotective effects of estradiol-17beta: implications for psychiatric disorders. *Arch Women Ment Health* 2002;5:105-110

Kostis JB, Rosen RC, Wilson AC. Central nervous system effects of HMG CoA reductase inhibitors: lovastatin and pravastatin on sleep and cognitive performance in patients with hypercholesterolemia. *J Clin Pharmacol* 1994;34:989-996

Kuhl H. Cardiovascular disease and estrogen replacement therapy- epidemiological data. In: Lippert TH und Mück AO, Hrsg., *Sex Steroids and the Cardiovascular System*. London: Parthenon, 1998:97-109

Kuhl H. Klimakterium, Postmenopause und Hormonsubstitution. Bremen, Uni-Med science, 2001

Kuhl H, Taubert H-D. Sexualsteroid. In: Kuhl H und Taubert H-D, Hrsg., *Das Klimakterium*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1987:90-93

Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, Havlik RJ. Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging* 2000;21:49-55

Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M, Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001;27:79-83

Leoni V, Lütjohann D, Masterman T. Levels of 7-oxocholesterol in cerebrospinal fluid are more than one thousand times lower than reported in multiple sclerosis. *J Lipid Res* 2005;46:191-195

Lin Y, Smith LL. Sterol metabolism XXVIII. Biosynthesis and accumulation of cholest-5-ene-3 β ,24-diol (cerebrosterol) in developing rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1974;348:189-196

Lobo RA, Nguyen HN, Eggena P, Brenner PF. Biologic effects of equilin sulfate in postmenopausal women. *Fertil Steril* 1988;49:234-238

Locatelli S, Lütjohann D, Schmidt HH, Otto C, Beisiegel U, von Bergmann K. Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia: evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. *Arch Neurol* 2002;59:213-216

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002;59:1258-1263

Lund EG, Guileyardo JM, Russel D. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96:7238-7243

Lütjohann D, Björkhem I, Locatelli S, Dame C, Schmolling J, von Bergmann K, Fahnenstich H. Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24S-hydroxycholesterol. *Acta Paediatr* 2001;90:652-657

Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, Björkhem I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9799-9804

Lütjohann D, Brzezinka A, Barth E, Abramowski D, Staufienbiel M, von Bergmann K, Beyreuther K, Multhaup G, Bayer TA. Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. *J Lipid Res* 2002;43:1078-1085

Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 2000;41:195-198

Lütjohann D, Stroick M, Bertsch T, Kuhl S, Lindenthal B, Thelen K, Andersson U, Björkhem I, Bergmann K, Fassbender K. High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. *Steroids* 2004;69:431-438

Lütjohann D, von Bergmann K. 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism. *Pharmacopsychiatry* 2003;36 Suppl 2:S102-106

Matthews K, Cauley J, Yaffe K, Zmuda JM. Estrogen replacement therapy and cognitive decline in older community women. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:518-523

McFarland KF, Boniface ME, Hornung CA, Earnhardt W, Humphries JO. Risk factors and noncontraceptive estrogen use in women with and without coronary disease. *Am Heart J* 1989;117:1209-1214

Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 1990;131:20-31

Miller KJ, Conney JC, Rasgon NL, Fairbanks LA, Small GW. Mood symptoms and cognitive performance in women estrogen users and nonusers and men. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:1826-1830

Moroney JT, Tang MX, Berglund L, Small S, Merchant C, Bell K, Stern Y, Mayeux R. Low-density lipoprotein cholesterol and the risk of dementia with stroke. *JAMA* 1999;282:254-260

Mortel KF, Meyer JS. Lack of postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1995;7:334-337

Mueck AO, Seeger H, Deuringer FU, Wallwiener D. Effect of an estrogen/statin combination on biochemical markers of endothelial function in human coronary artery cell cultures. *Menopause* 2001;8:216-221

Muldoon MF, Barger SD, Ryan CM, Flory JD, Lehoczky JP, Matthews KA, Manuck SB. Effects of lovastatin on cognitive function and psychological well-being. *Am J Med* 2000;108:538-546

Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, Koss E, Pfeiffer E, Jin S, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. Alzheimer's Disease Cooperative Study. *JAMA* 2000;283:1007-1015

Neele SJ, Evertz R, Genazzani AR, Luisi M, Netelenbos C. Raloxifene treatment increases plasma levels of beta-endorphin in postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 2002;77:1110-1117

Neele SJ, Rombouts SA, Bierlaagh MA, Barkhof F, Scheltens P, Netelenbos JC. Raloxifene affects brain activation patterns in postmenopausal women during visual encoding. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1422-1424

Nickelsen T, Lufkin EG, Riggs BL, Cox DA, Crook TH. Raloxifene hydrochloride, a selective estrogen receptor modulator: safety assessment of effects on cognitive function and mood in postmenopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:115-128

Ohkura T, Isse K, Akazawa K, Hamamoto M, Yaoi Y, Hagino N. Evaluation of estrogen treatment in female patients with dementia of the Alzheimer type. *Endocr J* 1994;41:361-371

Osono Y, Woollett LA, Marotti KR, Melchior GW, Dietschy JM. Centripetal cholesterol flux from extrahepatic organs to the liver is independent of the concentration of high density lipoprotein-cholesterol in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4114-4119

Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 1994;140:256-261

Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptok U, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* 2002;36:27-32

Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, Björkhem I, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral

indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2000;11:1959-1962

Parrish HM, Carr CA, Hall DG, King TM. Time interval from castration in premenopausal women to development of excessive coronary atherosclerosis. *Am J Obstet Gynecol* 1967;99:155-162

Petrides P. Endokrine Funktionen: Hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G und Petrides P, Hrsg., *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2003:888-903

Phillips SM, Sherwin BB. Effects of estrogen on memory function in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:485-495

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1987;917:148-161

Poirier J. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 2003;9:94-101

Polderman KH, Stehouwer CD, van Kamp GJ, Dekker GA, Verheugt FW, Gooren LJ. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med* 1993;118:429-432

Polo-Kantola P, Portin R, Polo O, Helenius H, Irjala K, Erkkola R. The effect of short-term estrogen replacement therapy on cognition: a randomized, double-blind, cross-over trial in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1998;91:459-466

Post MS, van der Mooren MJ, van Baal WM, Neele SJ, Netelenbos JC, Kenemans P. Raloxifene reduces impedance to flow within the uterine artery in early postmenopausal women: a 2-year randomized, placebo-controlled, comparative study. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:557-562

Princen HMG, Post SM, Twisk J. Regulation of bile acid synthesis. *Curr Pharm Design* 1997;3:59-84

Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LA, Berezovska O, Hyman BT, Chang TY, Tanzi RE, Kovacs DM. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide. *Nat Cell Biol* 2001;3:905-912

Rauramo L, Lagerspetz K, Engblom P, Punnonen R. The effect of castration and peroral estrogen therapy on some psychological functions. *Front Horm Res* 1975;3:94-104

Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 2000;7:321-331

Reihner E, Rudling M, Stahlberg D, Berglund L, Ewerth S, Björkhem I, Einarsson K, Angelin B. Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol. *N Engl J Med* 1990;323:224-228

Resnick SM, Henderson VW. Hormone therapy and risk of Alzheimer disease: a critical time. *JAMA* 2002;288:2170-2172

Resnick SM, Metter EJ, Zonderman AB. Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory. A possible protective effect? *Neurology* 1997;49:1491-1497

Rice MM, Graves AB, McCurry SM, Gibbons LE, Bowen JD, McCormick WC, Larson EB. Postmenopausal estrogen and estrogen-progestin use and 2-year rate of cognitive change in a cohort of older Japanese American women: The Kame Project. *Arch Intern Med* 2000;160:1641-1649

Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 2002;59:223-227

Rohkamm R. Taschenatlas Neurologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2000

Rosenberg L, Palmer JR, Shapiro S. A case-control study of myocardial infarction in relation to use of estrogen supplements. *Am J Epidemiol* 1993;137:54-163

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-333

Roth T, Richardson GR, Sullivan JP, Lee RM, Merlotti L, Roehrs T. Comparative effects of pravastatin and lovastatin on nighttime sleep and daytime performance. *Clin Cardiol* 1992;15:426-432

Rücker G, Neugebauer M, Willems GG. Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysenmethoden. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1992

Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:126-135

Schönknecht P, Lütjohann D, Pantel J, Bardenheuer H, Hartmann T, von Bergmann K, Beyreuther K, Schroder J. Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci Lett* 2002;324:83-85

Senanarong V, Vannasaeng S, Pongvarin N, Ploybutr S, Udompunthurak S, Jamjumras P, Fairbanks L, Cummings JL. Endogenous estradiol in elderly individuals: cognitive and noncognitive associations. *Arch Neurol* 2002;59:385-389

Sherwin BB. Estrogen and/or androgen replacement therapy and cognitive functioning in surgically menopausal women. *Psychoneuroendocrinology* 1988;13:345-357

Sherwin BB. Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev* 2003;24:133-151

Shumaker SA, Legault C, Rapp SR, Thal L, Wallace RB, Ockene JK, Hendrix SL, Jones BN, 3rd, Assaf AR, Jackson RD, Kotchen JM, Wassertheil-Smoller S, Wactawski-Wende J. Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;289:2651-2662

Simons M, Schwarzler F, Lütjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB. Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol* 2002;52:346-350

Skoog I. Vascular aspects in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 2000;59:37-43

Skoog I, Lernfelt B, Landahl S, Palmertz B, Andreasson LA, Nilsson L, Persson G, Oden A, Svanborg A. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* 1996;347:1141-1145

Smolders RG, Vogelvang TE, Mijatovic V, van Baal WM, Neele SJ, Netelenbos JC, Kenemans P, van der Mooren MJ. A 2-year, randomized, comparative, placebo-controlled

study on the effects of raloxifene on lipoprotein(a) and homocysteine. *Maturitas* 2002;41:105-114

Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC, 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 1994;126:88-94

Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 1991;20:47-63

Steffens DC, Norton MC, Plassman BL, Tschanz JT, Wyse BW, Welsh-Bohmer KA, Anthony JC, Breitner JC. Enhanced cognitive performance with estrogen use in nondemented community-dwelling older women. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:1171-1175

Sudhop T, Lütjohann D, Kodali A, Igel M, Tribble DL, Shah S, Perevozskaya I, von Bergmann K. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 2002;106:1943-1948

Sullivan JM, Vander Zwaag R, Hughes JP, Maddock V, Kroetz FW, Ramanathan KB, Mirvis DM. Estrogen replacement and coronary artery disease. Effect on survival in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 1990;150:2557-2562

Sullivan JM, Vander Zwaag R, Lemp GF, Hughes JP, Maddock V, Kroetz FW, Ramanathan KB, Mirvis DM. Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1988;108:358-363

Swan GE, LaRue A, Carmelli D, Reed TE, Fabsitz RR. Decline in cognitive performance in aging twins. Heritability and biobehavioral predictors from the National Heart, Lung, and Blood Institute Twin Study. *Arch Neurol* 1992;49:476-481

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996;348:429-432

Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lütjohann D, Moore C, Svetlik D. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2003;60:510-515

Vogelvang TE, Leurs JR, van der Mooren MJ, Mijatovic V, Hendriks DF, Neele SJ, Netelenbos JC, Kenemans P. Raloxifene reduces procarboxypeptidase U, an antifibrinolytic marker. A 2-year randomized, placebo-controlled study in healthy early postmenopausal women. *Menopause* 2004;11:110-115

Vogelvang TE, Mijatovic V, Kamp O, Netelenbos JC, Neele SJ, Pines A, Kenemans P, van der Mooren MJ. Neither long-term treatment with raloxifene nor hormone replacement therapy modulate cardiac function in healthy postmenopausal women: two randomized, placebo-controlled, 2-year studies. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:729-736

Vogelvang TE, Mijatovic V, van der Mooren MJ, Pinsdorf U, von Bergmann K, Netelenbos JC, Lütjohann D. Effect of raloxifene and hormone therapy on serum markers of brain and whole-body cholesterol metabolism in postmenopausal women. *Maturitas* 2005;50:312-320

Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW. Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *JAMA* 1998;279:1445-1451

Wang PN, Liao SQ, Liu RS, Liu CY, Chao HT, Lu SR, Yu HY, Wang SJ, Liu HC. Effects of estrogen on cognition, mood, and cerebral blood flow in AD: a controlled study. *Neurology* 2000;54:2061-2066

White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore LG. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* 1995;16:739-751

Whittaker PG, Morgan MR, Dean PD, Cameron EH, Lind T. Serum equilin, oestrone, and oestradiol levels in postmenopausal women receiving conjugated equine oestrogens ('Premarin'). *Lancet* 1980;1:14-16

Wikvall K. Hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria catalyzing 26-hydroxylation of C27-steroids. *J Biol Chem* 1984;259:3800-3804

Wilcox JG, Hatch IE, Gentzschein E, Stanczyk FZ, Lobo RA. Endothelin levels decrease after oral and nonoral estrogen in postmenopausal women with increased cardiovascular risk factors. *Fertil Steril* 1997;67:273-277

Wilson PW, Garrison RJ, Abbott RD, Castelli WP. Factors associated with lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study. *Arteriosclerosis* 1983;3:273-281

Witteaman JC, Grobbee DE, Kok FJ, Hofman A, Valkenburg HA. Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause. *BMJ* 1989;298:642-644

Wolf OT, Kudielka BM, Hellhammer DH, Torber S, McEwen BS, Kirschbaum C. Two weeks of transdermal estradiol treatment in postmenopausal elderly women and its effect on memory and mood: verbal memory changes are associated with the treatment induced estradiol levels. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24:727-741

Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 2000;57:1439-1443

Yaffe K, Barrett-Connor E, Lin F, Grady D. Serum lipoprotein levels, statin use, and cognitive function in older women. *Arch Neurol* 2002;59:378-384

Yaffe K, Haan M, Byers A, Tangen C, Kuller L. Estrogen use, APOE, and cognitive decline: evidence of gene-environment interaction. *Neurology* 2000a;54:1949-1954

Yaffe K, Krueger K, Sarkar S, Grady D, Barrett-Connor E, Cox DA, Nickelsen T. Cognitive function in postmenopausal women treated with raloxifene. *N Engl J Med* 2001;344:1207-1213

Yaffe K, Lui LY, Grady D, Cauley J, Kramer J, Cummings SR. Cognitive decline in women in relation to non-protein-bound oestradiol concentrations. *Lancet* 2000b;356:708-712

Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 1998;279:688-695

Yaffe K, Krueger K, Cummings SR, Blackwell T, Henderson VW, Sarkar S, Ensrud K, Grady D. Effect of Raloxifene on Prevention of Dementia and Cognitive Impairment in Older Women: The Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Randomized Trial. *Am J Psychiatry* 2005;162:683-90

Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, Ohmori S, Nomiya K, Kawano H, Ueda K, et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and

Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology* 1995;45:1161-1168

Yu L, von Bergmann K, Lütjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res* 2004;45:301-307

Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, Welsh-Bohmer KA, Mayer LS, Steffens DC, Breitner JC. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 2002;288:2123-2129

Zandi PP, Sparks DL, Khachaturian AS, Tschanz J, Norton M, Steinberg M, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:217-224

Zimetbaum P, Frishman WH, Ooi WL, Derman MP, Aronson M, Gidez LI, Eder HA. Plasma lipids and lipoproteins and the incidence of cardiovascular disease in the very elderly. The Bronx Aging Study. *Arterioscler Thromb* 1992;12:416-423

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. K. von Bergmann, Direktor der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn, in dessen Abteilung ich diese Arbeit durchführen durfte.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Privat-Dozent Dr. Dr. Dieter Lütjohann für die Überlassung des Themas, für seine immer freundliche Anleitung und Hilfe und sein unermüdliches Engagement.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Marius J. van der Mooren und Prof. J.C. Netelenbos, Leiter des Projektes „Alternde Frauen“ an der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie der Freien Universität Amsterdam, Niederlande, danke ich für die Überlassung der Sera und der Basisdaten der Studienteilnehmerinnen, insbesondere auch Frau Tatjana E. Vogelvang und Prof. Dr.V. Mijatovic für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Diskussionen.

Herrn Dr. R. Fimmers, Inst. für Medizinische Biometrie, Informatik u. Epidemiologie des Universitätsklinikums Bonn danke ich für die freundliche Beratung zur statistischen Auswertung der Daten.

Danken möchte ich auch Frau Anja Kerksiek und Frau Silvia Friedrichs für ihre freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Analysen.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meinem Ehemann und meinen Kindern, die in dieser Zeit viel Geduld aufbringen mussten.