

**Institut für Tierwissenschaften**

**Abteilung Biochemie**

**angefertigt in der**

**Abteilung für Klinische Pharmakologie**

**der Medizinischen Klinik der Universitätskliniken Bonn**

---

**Einfluss einer phytosterol- und phytostanolreichen Ernährung  
auf den Sterol- und Stanolstoffwechsel bei heterozygoten und homozygoten  
Watanabe Kaninchen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft

(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 25.01.2007

von

Christiane Fricke

aus Bonn

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Referent: Prof. Dr. Klaus von Bergmann

Koreferentin: Prof. Dr. Brigitte Schmitz

Erscheinungsjahr: 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 02. April 2007

Diese Arbeit wurde im Namen des NOFORISK Konsortiums angefertigt.

Die Finanzierung erfolgte durch das 6<sup>th</sup> Framework Food Quality and Safety Programme,  
Projekt Nr. FP6-506387.

## **Einfluss einer phytosterol- und phytostanolreichen Ernährung auf den Sterol- und Stanolstoffwechsel bei heterozygoten und homozygoten Watanabe Kaninchen**

Die Hypercholesterolämie ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose und der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit. Die Anreicherung von Lebensmitteln mit Phytosterolen oder Phytostanolen zur Senkung des Plasma-Cholesterols ist daher von immer größerem Interesse. Neben der cholesterolsenkenden Eigenschaft werden in letzter Zeit aber auch mögliche Nebenwirkungen durch den Anstieg der Plasmakonzentrationen von Phytosterolen diskutiert.

Zur Überprüfung des Nutzens und der Risiken einer hochdosierten Zufuhr von Phytosterol- und Phytostanolestern, wurden heterozygote und homozygote Watanabe (WHHL-) Kaninchen, ein Tiermodell für die familiäre Hypercholesterolämie, entweder mit 1.7 % oder 3.4 % Phytostanolestern oder mit 3.4 % Phytosterolestern gefüttert. Die heterozygoten WHHL-Kaninchen erhielten zusätzlich noch 0.2 % Cholesterol mit dem Futter. Mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie wurden die Cholesterol- und Lathosterolkonzentration (Cholesterol-Vorstufe) sowie die Konzentrationen der Phytosterole und Phytostanole in Plasma, Galle, Leber, Intima der Aorta und im Gehirn der Tiere bestimmt. Auch die Plaquebildung in der Aorta der Kaninchen wurde ausgewertet.

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen konnten Phytosterole und -stanole, bei einer gleichzeitigen Fütterung von Cholesterol, einen Anstieg der Plasma-Cholesterolkonzentration verhindern. Die extrem hohen Plasma-Cholesterolkonzentrationen, die bei den homozygoten Watanabe Kaninchen nicht auf eine alimentäre Zufuhr von Cholesterol zurückzuführen waren, wurden durch Phytosterole und Phytostanole jedoch nicht beeinflusst. Bei allen Kaninchen stiegen die Phytosterol- und Phytostanolkonzentrationen im Plasma unter der Zufuhr von Phytosterol- bzw. Phytostanolestern signifikant an. Die Plasmakonzentration der Phytostanole war jedoch um ein Vielfaches niedriger als die Phytosterolkonzentration. Zudem konnte durch Fütterung mit Phytostanolen die Konzentration von Phytosterolen gesenkt werden.

Bei den heterozygoten WHHL-Kaninchen konnten Phytosterole und Phytostanole die Entstehung von arteriellen Plaques verhindern. Bei den homozygoten WHHL-Kaninchen hingegen, zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Plaquefläche. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Phytosterole die Plaquebildung tendenziell erhöhen, während Phytostanole die Plaquefläche tendenziell verkleinern.

Interessanterweise konnte erstmals nachgewiesen werden, dass nicht nur die Phytosterole sondern auch Phytostanole bei Watanabe Kaninchen die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Die Konzentration der Phytosterole war auch im Gehirn deutlich höher als die der Phytostanole. Die Aufnahme der Phytosterole und -stanole in das Gehirn war jedoch limitiert. Die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) im Gehirn wurde durch die Fütterung mit Phytosterol-/Phytostanolestern nicht beeinflusst. Überraschenderweise war jedoch die Cholesterolkonzentration im Gehirn der heterozygoten WHHL-Kaninchen, die mit 3.4 % Phytosterol- oder mit 3.4 % Phytostanolestern gefüttert wurden, geringer als bei den Kontrolltieren.

## **Effect of a phytosterol and phytostanol enriched diet on sterol- and stanol metabolism in heterozygous and homozygous Watanabe rabbits**

Hypercholesterolemia is the main risk factor for the development of atherosclerosis and cardiovascular disease. Enrichment of foods with phytosterols or phytostanols to reduce plasma cholesterol concentrations finds therefore more and more interest. Beside these positive properties, recently also possible side effects of elevated plasma concentrations of phytosterols have been discussed.

To examine the risk and benefit of a high intake of phytosterol and phytostanol esters, heterozygous and homozygous Watanabe (WHHL-) rabbits, an animal model for familial hypercholesterolemia, received a chow enriched with 1.7 % or 3.4 % phytostanol esters or with 3.4 % phytosterol esters. Heterozygous rabbits were additionally fed with 0.2 % cholesterol. Cholesterol, the cholesterol precursor lathosterol, plant sterols, and plant stanols in plasma, bile, liver, intima of the aorta, and in brain of the animals were determined by gas chromatography and massspectrometry. Furthermore, plaque development in the aorta of the rabbits was evaluated.

In heterozygous WHHL-rabbits phytosterols and –stanols diminished the increase of plasma cholesterol concentration during simultaneous intake of cholesterol. High plasma cholesterol concentrations which were not due to the dietary intake of cholesterol in homozygous Watanabe rabbits were not altered by phytosterol and –stanol feeding. In all rabbits plasma plant sterol and stanol levels increased significantly with phytosterol and phytostanol ester feeding, respectively. However, plasma phytostanol levels were much lower than plasma phytosterol concentrations. Moreover, phytostanol feeding lowered plasma phytosterol concentrations.

In heterozygous rabbits phytosterols and -stanols reduced the development of atherosclerotic plaques. In homozygous WHHL-rabbits there were no significant differences in the size of plaque area between the groups. However, there was a tendency that phytosterols induced plaque formation whereas phytostanols reduced plaque areas.

Interestingly, the present study demonstrated for the first time that not only phytosterols but also phytostanols can pass the blood-brain barrier in Watanabe rabbits. Phytostanol concentrations in the brain were also lower than phytosterol concentrations. However, phytosterol and –stanol uptake into the brain was limited. Cholesterol synthesis in brain (lathosterol/cholesterol) was not affected by feeding phytosterol or phytostanol esters. Surprisingly, cholesterol concentration in brain of heterozygous rabbits fed with 3.4 % sterol or 3.4 % stanol esters was lower compared with control animals.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>9</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>10</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>14</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>16</b>
1.1 CHOLESTEROL.....	16
1.1.1 Eigenschaften, Vorkommen und Funktion.....	16
1.1.2 Der Cholesterolmetabolismus .....	17
1.1.3 Die Bedeutung von Cholesterol bei der Entstehung der Arteriosklerose.....	18
1.2 PHYTOSTEROLE UND PHYTOSTANOLE .....	20
1.2.1 Eigenschaften, Vorkommen und Funktion.....	20
1.2.2 Metabolismus der Phytosterole und -stanole .....	21
1.3 FAMILIÄRE HYPERCHOLESTEROLÄMIE: WATANABE KANINCHEN ALS TIERMODELL 23	
1.3.1 Familiäre Hypercholesterolämie .....	23
1.3.2 Watanabe Kaninchen als Tiermodell .....	25
1.4 PHYTOSTEROLÄMIE.....	26
1.5 WIRKUNG DER PFLANZLICHEN STEROLE UND STANOLE.....	27
1.5.1 Die Cholesterolresorption .....	27
1.5.2 Die cholesterolsenkende Wirkung der Phytosterole und Phytostanole.....	28
1.5.3 Nebenwirkungen von Phytosterolen und Phytostanolen.....	31
1.6 PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT .....	32
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
2.1 STUDIENDESIGN .....	35
2.1.1 NOFORISK.....	35
2.1.2 Design der Pilotstudien .....	36
Design der ersten Pilotstudie - 19 Tage .....	36
Design der zweiten Pilotstudie - 28 Tage.....	37
2.1.3 Design der Hauptstudien .....	38
Design der ersten Hauptstudie - Homozygote Watanabe Kaninchen .....	39
Design der zweiten Hauptstudie - Heterozygote Watanabe Kaninchen .....	40
2.2 METHODIK .....	41

2.2.1	Gewinnung der Proben.....	41
2.2.2	Materialien .....	42
2.2.3	Aufarbeitung von Plasmaproben und Galle .....	43
2.2.4	Aufarbeitung von Gewebeproben .....	44
2.2.5	Gaschromatographische Analyse .....	45
2.2.6	Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse .....	48
2.2.7	Histologische Untersuchung der Aorta .....	52
2.2.8	Statistische Berechnung .....	53
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
3.1	FUTTER .....	54
3.2	ERGEBNISSE DER PILOTSTUDIEN .....	56
3.2.1	Ergebnisse der 19-Tages Studie .....	56
	Plasmakonzentrationen.....	56
3.2.2	Ergebnisse der 28-Tages Studie .....	60
	Plasmakonzentrationen.....	60
3.3	ERGEBNISSE DER HAUPTSTUDIEN.....	63
3.3.1	Homozygote Watanabe Kaninchen.....	63
	Plasmakonzentrationen.....	63
	Leber.....	66
	Galle .....	67
	Intima der Aorta .....	68
	Gehirn.....	71
3.3.2	Heterozygote Watanabe Kaninchen .....	74
	Plasmakonzentrationen.....	74
	Leber.....	76
	Galle .....	78
	Intima der Aorta .....	79
	Gehirn.....	82
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
4.1	WIRKUNG DER PHYTOSTEROL- UND PHYTOSTANOLFÜTTERUNG AUF DIE ZIRKULATION.....	86
4.2	EINFLUSS DER PHYTOSTEROL- UND PHYTOSTANOLFÜTTERUNG AUF DIE ARTERIOSKLEROSE.....	92

4.3	EINFLUSS DER PHYTOSTEROL- UND PHYTOSTANOLFÜTTERUNG AUF DEN CHOLESTEROLSTOFFWECHSEL IM GEHIRN.....	95
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	99
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	102
7	ANHANG.....	114
8	DANKSAGUNG .....	138
	VERZEICHNIS DER VERÖFFENTLICHUNGEN, POSTERPRÄSENTATIONEN UND VORTRÄGE .....	139
	LEBENS LAUF .....	141



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b>	Strukturformel des Cholesterols (5-Cholesten-3 $\beta$ -ol).....	16
<b>Abbildung 1.2:</b>	Beginn der Arteriosklerose in einer Arterie.....	19
<b>Abbildung 1.3:</b>	Seitenkette der Phytosterole und Sättigung der $\Delta$ 5-Doppelbindung der Phytostanole.....	21
<b>Abbildung 1.4:</b>	Regulation der intestinalen Absorption von Cholesterol und Phytosterolen durch die ABCB5 und ABCG8 und den NPC1L1 Transporter (von Bergmann <i>et al.</i> , 2005).....	23
<b>Abbildung 2.1:</b>	Eichkurve für Cholesterol mit 5 $\alpha$ -Cholestan als internem Standard....	47
<b>Abbildung 2.2:</b>	Der massenselektive Detektor (MSD).....	49
<b>Abbildung 2.3:</b>	Chromatogramm eines Kontrollserums zur Analyse von Sterolen und Stanolen mit Epikoprostanol als internem Standard. Die Zahlen neben den Substanznamen geben die Fragmentmassen wieder, welche zur Messung der jeweiligen Substanz eingestellt wurden. Die Abbildung wurde aus Chromatogrammen der einzelnen Massen zusammengestellt.....	52
<b>Abbildung 3.1:</b>	Plasma Cholesterolkonzentration (MW $\pm$ SD) von heterozygoten (n = 7) (A) und homozygoten (n = 5) (B) Watanabe Kaninchen an Tag 1 und Tag 28 (* = p $\leq$ 0.05, ** = p $\leq$ 0.01, *** = p $\leq$ 0.001 Tag 1 vs. Tag 28) in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt des Futters.....	61
<b>Abbildung 3.2:</b>	Ratio von Lathosterol zu Cholesterol (MW $\pm$ SD) bei heterozygoten (n = 7) (A) und homozygoten (n = 5) (B) Watanabe Kaninchen an Tag 1 und Tag 28 (* = p $\leq$ 0.05, ** = p $\leq$ 0.01, *** = p $\leq$ 0.001 Tag 1 vs. Tag 28) in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt des Futters.....	62
<b>Abbildung 3.3:</b>	Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol (A) und von Campestanol zu Sitostanol (B) im Plasma und im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (MW $\pm$ SD, n = 18, Sterolester n = 17) (* = p $\leq$ 0.05, ** = p $\leq$ 0.01, *** = p $\leq$ 0.001).....	73
<b>Abbildung 3.4:</b>	Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol (A) und von Campestanol zu Sitostanol (B) im Plasma und im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (MW $\pm$ SD, n = 9) (* = p $\leq$ 0.05, ** = p $\leq$ 0.01, *** = p $\leq$ 0.001).....	84

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Gruppeneinteilung der 19-Tages-Studie.....	37
Tabelle 2.2	Gruppeneinteilung der 28-Tages Studie .....	38
Tabelle 2.3	Gruppeneinteilung der ersten Hauptstudie mit homozygoten WHHL-Kaninchen	39
Tabelle 2.4	Gruppeneinteilung der zweiten Hauptstudie mit heterozygoten WHHL-Kaninchen.....	40
Tabelle 2.5	Retentionszeiten der analysierten Sterole.....	46
Tabelle 2.6	Eichgeradencharakteristika und Nachweisgrenzen .....	49
Tabelle 2.7	Retentionszeiten und Molekülmassen der analysierten Sterole und Stanole.....	50
Tabelle 3.1	Sterol- und Stanolgehalt des Futters der Vorstudien .....	54
Tabelle 3.2	Sterol- und Stanolgehalt des Futters der Hauptstudien.....	55
Tabelle 3.3	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD).....	57
Tabelle 3.4	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei homozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD).....	59
Tabelle 3.5	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol bei homozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17)..	65
Tabelle 3.6	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Leber von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17).....	66
Tabelle 3.7	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17) .....	68
Tabelle 3.8	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Intima der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17)..	69
Tabelle 3.9	Fläche der Plaques und die Ratio von Intima zu Media in der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17) *	70
Tabelle 3.10	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17).....	72

Tabelle 3.11	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD).....	75
Tabelle 3.12	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD).....	77
Tabelle 3.13	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD).....	79
Tabelle 3.14	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD).....	80
Tabelle 3.15	Plauefläche und Ratio von Intima:Media in der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD)*.....	82
Tabelle 3.16	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD).....	83
Tabelle A1	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD).....	114
Tabelle A2	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei homozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD).....	115
Tabelle A3	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD).....	116
Tabelle A4	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD).....	117
Tabelle A5	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD).....	118
Tabelle A6	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD).....	119

Tabelle A7	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futten (n = 7, MW ± SD).....	120
Tabelle A8	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD) .....	121
Tabelle A9	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD) .....	122
Tabelle A10	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD) .....	123
Tabelle A11	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	124
Tabelle A12	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	125
Tabelle A13	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	126
Tabelle A14	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	127
Tabelle A15	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	128
Tabelle A16	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	129
Tabelle A17	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	130
Tabelle A18	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD) .....	131

Tabelle A19	Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD) .....	132
Tabelle A20	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD) .....	133
Tabelle A21	Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD) .....	134
Tabelle A22	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD) .....	135
Tabelle A23	Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD) .....	136
Tabelle A24	Plaquerfläche und die Ratio von Intima:Media der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)* .....	137

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ATP III	Adult Treatment Panel III
CEPT	Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein
dl	Deziliter
EI	Elektronenstoß
EU	Europäische Union
et al.	et alii
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GLC	Gas-Flüssigkeits-Chromatographie
GLP	Good Laboratory Practice
HDL	High-Density-Lipoprotein
hH	Heterozygot
HH	Homozygot
HMG-CoA	3-Hydroxy-3methyl-glutaryl-Coenzym-A
IDL	Intermediate-Density-Lipoprotein
k.o.	knock out
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase
LDL	Low-Density-Lipoprotein
m	Meter
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie

MSD	Massenselektiver Detektor
MTP	Mikrosomales-Triglyzerid-Transfer-Protein
MW	Mittelwert
m/z	Masse / Ladung
n	Stichprobenumfang
ng	Nanogramm
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like1 Protein
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
r	Korrelationskoeffizient
SCF	Scientific Committee on Food
sek	Sekunde
SD	Standardabweichung
SOP	Standard Operation Procedure
Tab.	Tabelle
V	Volt
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
WHHL	Watanabe-Hereditable-Hyperlipidemic-Rabbits
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

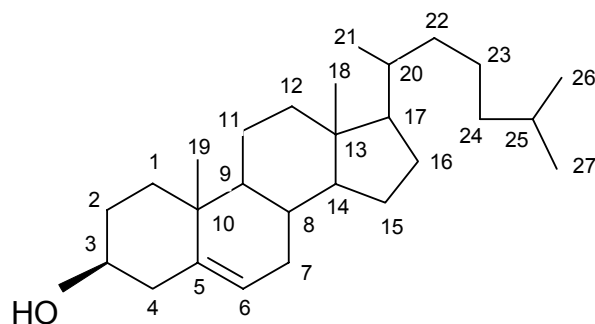
## 1.1 Cholesterol

### 1.1.1 Eigenschaften, Vorkommen und Funktion

Das Cholesterolmolekül ist eines der wenigen organischen Moleküle, welches die Wissenschaft schon seit vielen Jahrzehnten intensiv beschäftigt. Auf der einen Seite ist es ein lebensnotwendiger Bestandteil aller tierischen Zellmembranen und dient als Ausgangssubstrat für die Synthese von Gallensäuren und Steroidhormonen, andererseits ist es aber auch Ursache der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit (Bloch, 1992).

Nahrungscholesterol ist für den Körper nicht essentiell. In der Leber, aber auch im Darm und in der Haut, findet eine gesteuerte Eigensynthese statt, die den Bedarf abdeckt (Biesalski & Grimm, 1999).

Cholesterol ist ein sehr hydrophobes Molekül mit einer begrenzten Polarität, bedingt durch eine  $\beta$ -ständige Hydroxylgruppe am C3-Atom (Abb. 1.1). Die Polarität steigt mit der Anzahl der Hydroxylgruppen und verringert sich mit der Länge der Seitenkette. Durch seinen hydrophoben Charakter bestimmt das Cholesterol die Fluidität der Zellmembranen (Stryer, 1996). Diese Eigenschaft erschwert allerdings auch den Transport des Sterols in wässriger Umgebung.



**Abbildung 1.1:** Strukturformel des Cholesterols (5-Cholesten-3 $\beta$ -ol)



### 1.1.2 Der Cholesterolmetabolismus

Cholesterol, welches sich im Intestinaltrakt befindet, stammt entweder aus der Nahrung oder aus der biliären Sekretion. Die tägliche Cholesterolaufnahme mit der Nahrung liegt bei weniger als 50 mg (bei strengen Veganern) bis zu 750 mg. Die biliäre Cholesterolsekretion beträgt zwischen 480 und 2500 mg/Tag (von Bergmann *et al.*, 2005). Die prozentuale intestinale Cholesterolresorption liegt zwischen 20 und 80 %. Das bedeutet, dass die Menge an Cholesterol, die täglich resorbiert werden kann, zwischen 250 und 2500 mg/Tag liegt (Mok *et al.*, 1979).

Im gesunden Organismus stehen die körpereigene Synthese, die intestinale Aufnahme aus der Nahrung, der Transport in Lipoprotein-Partikeln und die biliäre Ausscheidung im Gleichgewicht (Sudhop *et al.*, 2005). Lipoproteine sind notwendig um die lipophilen Substanzen im Blut transportieren zu können. Cholesterol wird mit Hilfe des Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) Proteins, welches sich auf der Oberfläche der Enterozyten befindet, aus dem Intestinaltrakt in die intrazellulären Kompartimente der Darmschleimhaut aufgenommen (Davis *et al.*, 2004) (Abb. 1.4). Dort wird es bis zu 70 % mit Fettsäuren verestert, an Apolipoprotein B48 gebunden und mit Hilfe des Mikrosomalen-Triglyzerid-Transfer-Proteins (MTP) als Chylomikronen über die Lymphe in den Blutkreislauf sezerniert. Im Blut werden die in den Chylomikronen enthaltenen Triglyzeride durch die Lipoprotein-Lipase hydrolysiert. Die freiwerdenden Fettsäuren werden dann z.B. zur Energiegewinnung in die Muskeln oder zur Triglyzeridsynthese ins Fettgewebe abgegeben. Die cholesterolreichen Reste, welche man Chylomikronen-Remnants nennt, werden von der Leber über den ApoE-Rezeptor erkannt und aus dem Blutkreislauf entfernt (Rehner & Daniel, 2002). In der Leber synthetisierte Lipoproteine bezeichnet man als Very-Low-Density-Lipoproteins (VLDL). Sie sind reich an Triglyzeriden, welche sie zu den extrahepatischen Geweben transportieren. Auch hier werden mit Hilfe der Lipoprotein-Lipase die Triglyzeride hydrolysiert. Zugleich kommt es mit Hilfe der Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase (LCAT) zu einer Veresterung des Cholesterols. Als Übergangsform entsteht das IDL (Intermediate-Density-Lipoprotein) und mit zunehmender Triglyzeridabgabe das LDL (Low-Density-Lipoprotein)-Cholesterol. Die LDL-Partikel sind die cholesterolreichsten Lipoproteine. Ihre Zielzellen internalisieren sie mit Hilfe spezifischer LDL-Rezeptoren. Steigt der Cholesterolbedarf einer Zelle, so erhöht sich die Zahl der LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche (Brown & Goldstein, 1986).

High-Density-Lipoproteine (HDL) transportieren Cholesterol im sogenannten „reversen Cholesteroltransport“ aus extrahepatischen Geweben zurück zur Leber (Ginsberg, 1998; Lewis & Rader, 2005). Freies Cholesterol wird durch LCAT verestert und gespeichert. Die

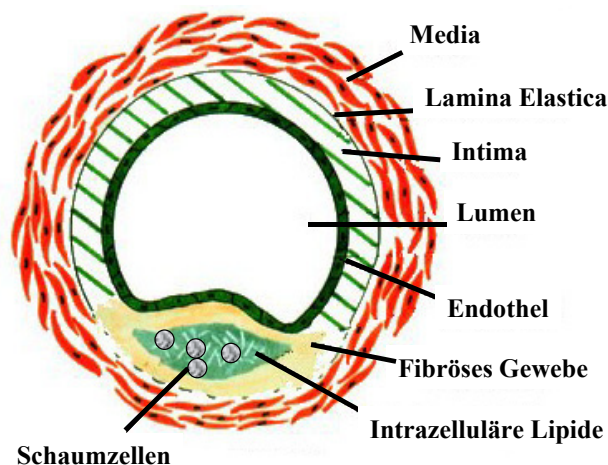
cholesterolbeladenen HDL-Partikel können nun auf zwei Wegen zurück zur Leber transportiert werden. Entweder sie werden direkt zur Leber transportiert und dort umgewandelt, oder das Cholesterol wird mit Hilfe des Cholesteryl-Ester-Transfer-Proteins (CEPT) auf andere Lipoproteine wie VLDL oder IDL übertragen und gelangt so zur Leber (Grundy & Denke, 1990; Lewis & Rader, 2005). Die Biosynthese des Cholesterols findet zu über 50 % in der Leber statt. Zu Beginn entsteht aus drei Molekülen Acetyl-CoA das 3-Hydroxy-3methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Dieses wird mit Hilfe des Schlüsselenzyms der Cholesterolbiosynthese, der HMG-CoA-Reduktase, zu Mevalonat reduziert. Nach drei enzymkatalysierten Phosphorylierungen und einer Decarboxylierung entsteht daraus dann Isopentenylpyrophosphat. Aus sechs Molekülen Isopentenylpyrophosphat wird Squalen synthetisiert, welches anschließend zu Lanosterol zyklisiert wird. Über mehrere Zwischenschritte, wobei unter anderem die Precursor Desmosterol und Lathosterol entstehen, wird schließlich das Cholesterol gebildet (Stryer, 1996).

### **1.1.3 Die Bedeutung von Cholesterol bei der Entstehung der Arteriosklerose**

Arteriosklerose ist die Hauptursache für eine koronare Herzkrankheit. Eine erhöhte Cholesterolkonzentration im Blut stellt einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose dar. Zahlreiche Studien zeigen, dass die durch kardiovaskuläre Erkrankungen bedingte Mortalität in einem engen Zusammenhang mit der Cholesterolkonzentration im Plasma steht (Martin *et al.*, 1986; Stamler *et al.*, 1986; Verschuren *et al.*, 1995). Weitere Hauptrisikofaktoren sind neben einer erhöhten LDL-Cholesterolkonzentration im Blut, das Alter, niedriges HDL-Cholesterol, Rauchen, systolischer Bluthochdruck, eine positive Familienanamnese und Diabetes mellitus. Die Arteriosklerose kann als eine chronische Entzündung betrachtet werden, die durch eine Wechselwirkung von modifizierten Lipoproteinen, Makrophagen, T-Lymphozyten und den natürlichen Bestandteilen der Arterienwände bedingt wird (Glass & Witztum, 2001).

Voraussetzung für die Entstehung arteriosklerotischer Prozesse ist ein Schaden in der Endothelschicht der Arterienwand, welcher z.B. durch Bluthochdruck, Diabetes mellitus oder bakterielle Infektionen hervorgerufen wird. An diesen Stellen kommt es zu einer Anhaftung von Monozyten. Die Monozyten können in die Intima einwandern und dort zu ortsständigen Makrophagen differenzieren (Lucas & Greaves, 2001). Diese Entwicklung wird beschleunigt, wenn sich in der Läsion bereits LDL-Partikel aus dem Blut angesammelt haben. Diese abgelagerten Lipoproteine werden durch die Einwirkung von Sauerstoff aus dem Blut

oxidiert. Das oxidierte LDL wird von den Makrophagen mit Hilfe des Scavenger-Rezeptors aufgenommen. Aufgrund der zahlreichen Cholesterolveresikel, welche sich in ihrem Cytoplasma anreichern, werden die Makrophagen in ihrem späteren Stadium als Schaumzellen bezeichnet (Abb. 1.2). Sie sterben im weiteren Verlauf ab. Durch diesen Vorgang kommt es zu einer weiteren Einlagerung von LDL-Partikeln und Makrophagen, welche einen entzündlichen Prozess in der Intima initiieren. Diese Entzündung kann auf tiefere Bereiche der Arterienwand, wie die Media mit ihren Muskelzellen, übergehen und dort zu einem Gewebeumbau führen. In der Arterie entsteht dabei eine bindegewebsartige Kappe mit einem lipidhaltigen Kern (arteriosklerotischer Plaque). Der Lipidkern stammt aus den massenhaft abgestorbenen Schaumzellen, die große Mengen der oxidierten LDL-Partikel aufgenommen haben. Im Grenzbereich zwischen Bindegewebskapsel und Gefäßwand setzt sich die Bildung von Schaumzellen fort, sodass die Läsion fortschreitet und das Gefäß zunehmend enger wird. Durch den Gewebeumbau wird die Arterie brüchig und ist mechanisch nicht sehr belastbar. Zudem kommt es an der rauen Gefäßwand zu turbulenten Strömungen, sodass die Gefahr einer Thrombose erhöht ist (Ross, 1993; Fan & Watanabe, 2003).



**Abbildung 1.2:** Beginn der Arteriosklerose in einer Arterie

## 1.2 Phytosterole und Phytostanole

### 1.2.1 Eigenschaften, Vorkommen und Funktion

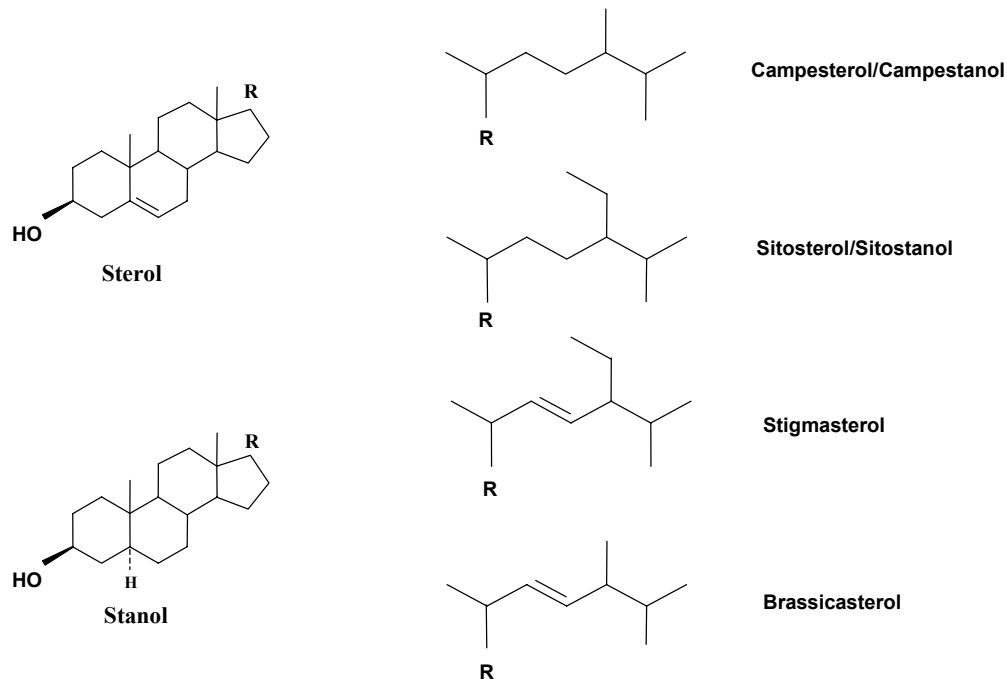
Als Phytosterole bezeichnet man Sterole, die von Pflanzen oder Pilzen synthetisiert werden. Wie das Cholesterol im tierischen Organismus, spielen sie in Pflanzen bei der Funktion und der Struktur der Zellmembranen eine große Rolle. Ebenfalls von Bedeutung sind die Phytosterole als Vorstufen für die Synthese von Phytosteroidhormonen, den Brassinosteroiden. Diese sind wichtig für das Pflanzenwachstum (Bajguz & Tretyn, 2003).

Pflanzliche Sterole unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur vom Cholesterol lediglich in einer Modifikation der Seitenkette. Campesterol beispielsweise zeichnet sich durch eine zusätzliche Methylgruppe am C-24 Atom, Sitosterol durch eine zusätzliche Ethylgruppe an Position 24 aus. Stigmasterol besitzt neben der Ethylgruppe an Position 24 eine zusätzliche Doppelbindung an Position 22 (Abb. 1.3). Phytostanole sind die gesättigten Derivate (5- $\alpha$ -Hydrierung) der Sterole.

Die am häufigsten vorkommenden Phytosterole sind Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol. In pflanzlichen Ölen liegt der Anteil von Sitosterol zwischen 45 und 95 % der Gesamtsterole, der Anteil von Campesterol bei ungefähr 30 % und der Anteil von Stigmasterol bei 25 % (Kritchevsky, 1997). In geringeren Mengen treten Brassicasterol, Avenasterol und die Stanole Campestanol und Sitostanol auf.

Da die Phytosterole, wie das Cholesterol, nur gering wasserlöslich sind, kommen sie besonders reichlich in Pflanzenteilen vor, in denen Fett oder Stärke gespeichert werden. Demnach sind pflanzliche Öle und deren Produkte, Getreidekörner und -produkte sowie Nüsse die sterolreichsten natürlichen Lebensmittel (Piironen *et al.*, 2000). Phytostanole können sowohl mit der Nahrung aufgenommen werden als auch endogen durch 5 $\alpha$ -Hydrierung von Phytosterolen entstehen (Salen *et al.*, 1985b).

Im menschlichen Körper gilt die Verminderung der Cholesterolresorption als wichtigste Eigenschaft der Phytosterole und -stanole. Hierauf wird später detailliert eingegangen (siehe Kapitel 1.5).



**Abbildung 1.3:** Seitenkette der Phytosterole und Sättigung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung der Phytostanole

### 1.2.2 Metabolismus der Phytosterole und -stanole

Die täglich mit der Nahrung aufgenommene Menge an Phytosterolen liegt zwischen 200 und 400 mg (von Bergmann *et al.*, 2005). Die Resorption der pflanzlichen Sterole im Darm ist im Vergleich zum Cholesterin jedoch wesentlich geringer. Während das Nahrungscholesterin im Mittel zu etwa 50 % resorbiert wird, liegt der Wert für Campesterol zwischen 9 und 18 % und für Sitosterol zwischen 5 und 8 % (Heinemann *et al.*, 1993; Lütjohann *et al.*, 1995; Ostlund *et al.*, 2002). Die Stanole sind lange Zeit für nicht resorbierbar gehalten worden (Ikeda & Sugano, 1978; Czubyko *et al.*, 1991; Hallikainen *et al.*, 2000b). Heinemann *et al.* hingegen, gaben im Jahre 1993 für Campestanol eine Resorptionsrate von 12,5 % an. Die Resorptionsrate vermindert sich mit zunehmender Kettenlänge und damit abnehmender Polarität sowie durch die Sättigung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung (Heinemann *et al.*, 1993; Igel *et al.*, 2003). Die Affinität zu den Mizellen und die Löslichkeit in den Mizellen scheinen hier von großer Bedeutung zu sein (Hamada *et al.*, 2006).

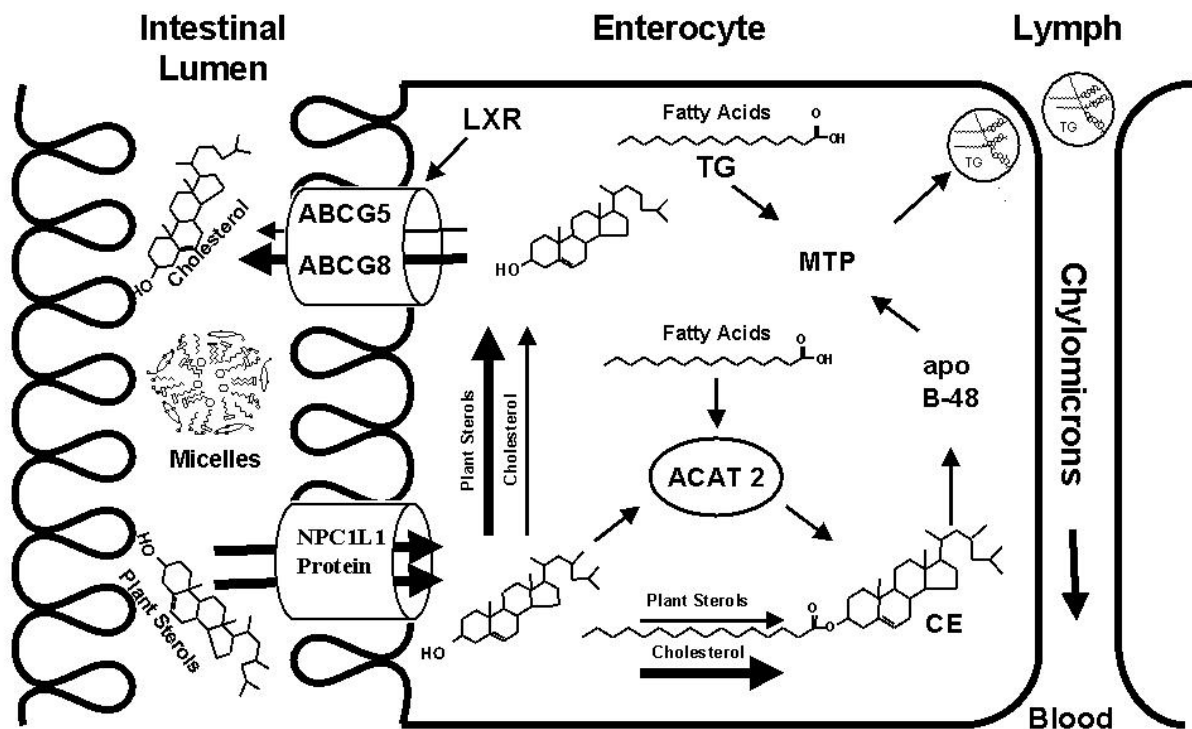
Im Blut werden die Phytosterole, wie das Cholesterol, mit den Lipoproteinen transportiert und liegen zum Teil als Fettsäureester vor. Zwei Drittel des Sitosterols und drei Viertel des Campesterols sind verestert, wobei der Anteil der veresterten Sterole von VLDL über LDL zum HDL ansteigt (Tilvis & Mietinen, 1986).

In der Literatur findet man bei gesunden, leicht hypercholesterolämischen Personen Konzentrationen für Campesterol von ungefähr 0.4 – 0.6 mg/dl und für Sitosterol von 0.2 – 0.3 mg/dl Serum (Salen *et al.*, 1992; Gylling *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; Sudhop *et al.*, 2002b; von Bergmann *et al.*, 2005). Da die anderen Sterole, sowie die Stanole Campestanol und Sitostanol, im Plasma normalerweise nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, wurden in früheren Studien seltener Konzentrationen angegeben. Sie lagen meist unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode. Mit zunehmender Entwicklung der Messmethoden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) findet man nun jedoch häufiger Konzentrationsangaben für die Stanole (Igel *et al.*, 2003; Sudhop *et al.*, 2003).

Tiere, wie zum Beispiel Kaninchen, haben bedingt durch ihre rein pflanzliche Ernährung höhere Phytosterolkonzentrationen im Serum als Menschen. Kritchevsky *et al.* (2003) ermittelten bei gesunden weißen Neuseeland Kaninchen eine Campesterolkonzentration von 1.56 mg/dl, die Sitosterolkonzentration lag bei 0.95 mg/dl, und für Sitostanol ergab sich ein Wert von 0.041 mg/dl. Zum Vorkommen pflanzlicher Sterole in Geweben und Organen liegen ebenfalls zahlreiche tierexperimentelle Daten vor (Sugano *et al.*, 1977; Bhattacharyya & Lopez, 1979; Sanders *et al.*, 2000; Kritchevsky *et al.*, 2003).

Die Aufnahme der Phytosterole und -stanole aus dem Intestinaltrakt erfolgt wie beim Cholesterol, mit Hilfe des Niemann-Pick C1 Like1 Proteins (Davis *et al.*, 2004) (Abb. 1.4). Die Ausscheidung der Phytosterole erfolgt mit der Galle. Sie werden aber nicht wie das Cholesterol in der Leber zu Gallensäuren metabolisiert (Boberg *et al.*, 1990). Die biliäre Exkretionsrate der Sterole steht im Gegensatz zu ihrer Absorptionsrate: Sitosterol wird schneller ausgeschieden als Campesterol und Campesterol schneller als Cholesterol (Sudhop *et al.*, 2002b). Ihre Exkretion wird durch die ATP-Binding Cassette Transporter (ABC) G5 und G8 reguliert. Diese Membranproteine werden apikal in der Leber und im Darm expremiert und sind für den Transport der Sterole in die Galle bzw. zurück in das intestinale Lumen zuständig. Entdeckt wurden diese Transporter bei der Untersuchung von Patienten mit Phytosterolämie (Berge *et al.*, 2000). Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die mit erhöhten Plasma-Sterolkonzentrationen, Xanthomen und einer sehr frühen Entwicklung einer Arteriosklerose einhergeht (siehe Kapitel 1.4). Grund ist eine

gesteigerte intestinale Absorption sowie eine verminderte biliäre Sekretion, die durch den Defekt einer der beiden Transporter hervorgerufen wird.



**Abbildung 1.4:** Regulation der intestinalen Absorption von Cholesterin und Phytosterolen durch die ABCG5 und ABCG8 und den NPC1L1 Transporter (von Bergmann *et al.*, 2005).

### 1.3 Familiäre Hypercholesterolämie: Watanabe Kaninchen als Tiermodell

#### 1.3.1 Familiäre Hypercholesterolämie

Die heterozygote familiäre Hypercholesterolämie ist eine der häufigsten genetisch bedingten Krankheiten beim Menschen. Sie zeichnet sich durch eine erhöhte Plasma LDL-Konzentration aus, welche die Entstehung der Arteriosklerose und das Risiko einer koronaren Herzkrankheit erheblich steigert (Marais & Firth, 2005). 1973 wurde erstmals ein Defizit an

LDL-Rezeptoren als Ursache dieser Erkrankung beschrieben. Mittlerweile sind mehr als 600 Mutationen der LDL-Rezeptor-Gene bekannt (Goldstein & Brown, 2001).

LDL-Rezeptoren befinden sich auf fast allen Zellen im Körper. Die höchste Konzentration befindet sich jedoch auf den Leberzellen. Dort wird überschüssiges Cholesterin in die Zelle aufgenommen. Kann das LDL aufgrund fehlender Rezeptoren nicht in die Leberzellen aufgenommen werden, so steigt die LDL-Plasmakonzentration an. Zudem kommt es in den Zellen aufgrund eines Cholesterinmangels zu einer erhöhten Produktion der cholesterinreichen Lipoproteine. Dadurch wird die LDL-Konzentration im Plasma noch weiter erhöht (Derfler, 2002).

Die Prävalenz der heterozygoten Form der familiären Hypercholesterolemie wird mit 1:500 beschrieben. Hier werden nur ungefähr die Hälfte der normalerweise vorkommenden LDL-Rezeptoren gebildet, und die Anzahl an LDL-Partikeln im Plasma ist durchschnittlich um das 2,5-fache erhöht (220 - 650 mg/dl). Bei der homozygoten Form mit einer Häufigkeit von 1:1 Millionen, werden keine LDL-Rezeptoren gebildet, und das LDL ist um das sechs- bis zehnfache erhöht (600 - 1000 mg/dl). Patienten mit dieser Form der Erkrankung sterben oft schon in jungen Jahren an der Folge eines Herzinfarktes (Goldstein & Brown, 2001).

Ein weiterer Grund für eine genetisch bedingte Hypercholesterolemie kann neben einem defekten LDL-Rezeptor auch ein Defekt des Apolipoproteins B-100 sein, welches normalerweise als Ligand für den LDL-Rezeptor fungiert (Innerarity *et al.*, 1987). Hierbei kann das LDL nicht mehr an den Rezeptor binden und verbleibt somit im Plasma. Die Häufigkeit dieser Erkrankung wird mit 1:500 bis 1:700 angegeben (Boren *et al.*, 2001; Whitfield *et al.*, 2004).

Die *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice* (2003) fordern für das Gesamt-Cholesterin im Plasma einen Wert von < 190 mg/dl und für das LDL-Cholesterin einen Wert von < 115 mg/dl (De Backer *et al.*, 2003). Besteht bereits eine kardiovaskuläre Erkrankung oder liegt ein Diabetes mellitus vor, so sollte das Gesamt-Cholesterin bei < 175 mg/dl und das LDL-Cholesterin bei < 100 mg/dl liegen. Laut *Adult Treatment Panel III* (ATP III) wird ein LDL-Cholesterin von < 160 mg/dl empfohlen, wenn kein oder ein Risikofaktor vorhanden ist, ein LDL-Cholesterin von < 130 mg/dl bei bis zu zwei zusätzlich vorhandenen Risikofaktoren und ein Wert von unter 100 mg/dl bei mehr als zwei Risikofaktoren (Grundy *et al.*, 2004). Risikofaktoren sind das Rauchen, Bluthochdruck (> 140/90 mm Hg), eine positive Familienanamnese, das Alter, Diabetes mellitus oder ein geringes HDL-Cholesterin. Ein HDL-Cholesterin von > 40 mg/dl bei Männern und > 50 mg/dl bei Frauen wird als erstrebenswert angesehen.



### 1.3.2 Watanabe Kaninchen als Tiermodell

Kaninchen weisen einige Charakteristika auf, welche sie zu exzellenten Modellen für die Untersuchung menschlicher genetischer Defekte und deren Auswirkungen auf den Lipoprotein-Metabolismus und die Anfälligkeit für die Entstehung der Arteriosklerose machen:

- 1) ihre Apolipoprotein B enthaltenden Lipoproteine sind in ihrer chemischen Zusammensetzung und in ihrem Apoproteingehalt mit denen des Menschen vergleichbar (Chapman, 1980)
- 2) ihre Leber editiert keine ApoB mRNA und sie produzieren somit ApoB-100 enthaltende VLDL auf die gleich Weise wie der Mensch (Greeve *et al.*, 1993)
- 3) das Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein, welches an der Übertragung von Cholesterol vom HDL auf die VLDL- und LDL-Partikel beteiligt ist und somit eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose spielt, ist sowohl bei Kaninchen als auch beim Menschen im Überfluss vorhanden (Nagashima *et al.*, 1988; Tall, 1993) und
- 4) Kaninchen sind sehr anfällig für eine durch die Ernährung induzierte Arteriosklerose (Wilson *et al.*, 1982; Kolodgie *et al.*, 1996).

Der Stamm der Watanabe (WHHL)-Kaninchen ist 1973 durch Inzucht eines Mutanten von weißen Neuseeland Kaninchen mit spontaner Hyperlipidämie entstanden. Die Tiere leiden, wie Patienten mit einer familiären Hypercholesterolämie, unter einem Defekt des LDL-Rezeptors und zeichnen sich demnach durch sehr hohe Plasma-Lipidkonzentrationen aus (Kita *et al.*, 1981). Die Plasma-Cholesterol- und Triglyzeridkonzentrationen der homozygoten Tiere können um das 8 -14-fache höher sein als bei gesunden Kaninchen, d.h. es können Plasma-Cholesterolkonzentrationen von 500 - 950 mg/dl vorliegen. Bei den heterozygoten WHHL-Kaninchen ist das Cholesterol nur leicht erhöht (Sun *et al.*, 2002). Zudem entwickeln Watanabe Kaninchen Xanthome und arteriosklerotische Läsionen, wie sie auch beim Menschen beobachtet werden können (Watanabe, 1980).

Da die aus der erhöhten Lipidkonzentration resultierenden Krankheitsstadien bei den WHHL-Kaninchen genauso verlaufen wie bei Menschen mit einer heterozygoten oder homozygoten familiären Hypercholesterolämie, eignet sich dieses Tiermodell sehr gut um Fragen hinsichtlich der Prävention, Entstehung und Bekämpfung dieser Krankheit zu beantworten (Aliev *et al.*, 2004). Zahlreiche Studien wurden schon an diesen Tieren durchgeführt (Tanzawa *et al.*, 1980; Kita *et al.*, 1981; Dietschy *et al.*, 1983; Atkinson *et al.*, 1989; Kroon *et al.*, 1993; Dowell *et al.*, 1995; Harsch *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2000; Clubb *et al.*, 2001; Fan &

Watanabe, 2003; Shiomi *et al.*, 2003; Rajamannan *et al.*, 2005). Dowell *et al.* (1995) bemängelten jedoch, dass obwohl die Prävalenz der heterozygoten Form der familiären Hypercholesterolämie deutlich höher ist als die der homozygoten Form, mehr Untersuchungen an homozygoten WHHL-Kaninchen durchgeführt wurden. In ihrer Studie zu der Entwicklung der Arteriosklerose in der Aorta verwendeten sie somit sowohl homozygote als auch heterozygote Tiere. Auch in der vorliegenden Studie wurden Kaninchen beider Genotypen untersucht.

Ergebnisse über den Einfluss von pflanzlichen Sterolen oder Stanolen auf die Plasma-Cholesterolkonzentration dieser Tiere sowie Daten über die Ablagerung der Phytosterole bzw. -stanole in den verschiedenen Geweben, wie sie in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, sind bisher nicht systematisch untersucht worden.

Watanabe Kaninchen sind kleiner als normale Neuseeland Kaninchen und ihre Züchtung ist schwieriger. Da Arteriosklerose aber ein weit verbreitetes Thema ist und viele Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt werden müssen, ist die Nachfrage nach diesen Tieren ständig gestiegen. Phelan *et al.* entwickelten deswegen 1985 eine Methode um die Anzahl der Nachkommen zu erhöhen.

#### **1.4 Phytosterolämie**

Die Phytosterolämie – auch bekannt als Sitosterolämie – ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch erhöhte Konzentrationen pflanzlicher Sterole und Stanole im Plasma und in den Geweben charakterisiert wird. Im Gegensatz zu gesunden Personen, bei denen die Gesamt-Plasmakonzentration an pflanzlichen Sterolen bei weniger als 1 mg/dl liegt, findet man bei Patienten mit homozygoter Sitosterolämie Werte bis zu 65 mg/dl. (Lütjohann *et al.*, 1995; Lütjohann *et al.*, 1996). Phytosterolämiepatienten haben zudem oft erhöhte Plasma-Cholesterolkonzentrationen und eine verminderte Cholesterolsynthese (Miettinen, 1980; Nguyen *et al.*, 1990; Lütjohann *et al.*, 1995). Bei heterozygoten Patienten sind die Plasmakonzentrationen der pflanzlichen Sterole meist nicht, oder nur leicht erhöht (Stalenhoef *et al.*, 2001). Klinische Symptome der Erkrankung sind Xanthome und eine frühzeitige, oft letal verlaufende Arteriosklerose in jugendlichem Alter (Bhattacharyya & Connor, 1974).

Die Erkrankung wurde zuerst im Jahre 1974 von Bhattacharyya und Connor bei zwei kaukasischen Schwestern entdeckt (Bhattacharyya & Connor, 1974). Von weiteren Fällen

berichteten Shulman *et al.* im Jahre 1976 und Miettinen im Jahre 1980 (Shulman *et al.*, 1976; Miettinen, 1980). Bis heute gibt es keine Angaben über eine Prävalenz dieser Krankheit. Man geht aber davon aus, dass es weltweit 50 - 80 bekannte Fälle der Phytosterolämie gibt (Salen *et al.*, 2004).

Ursache der Sitosterolämie sind Mutationen in den Genen der ABCG5- oder ABCG8-Transporter (Berge *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Die ABCG5- und ABCG8-Transporter werden apikal in der Membran der Hepatozyten sowie in den Zellen der intestinalen Mukosa als Heterodimere exprimiert. Dort vermitteln sie die Sekretion von pflanzlichen Sterolen und Stanolen sowie von Cholesterol in die Galle bzw. zurück in das intestinale Lumen (Yu *et al.*, 2002a; Yu *et al.*, 2002b). Ist einer der Transporter defekt, so kommt es zu einer erhöhten intestinalen Sterolabsorption und einer verminderten biliären Sekretion (Miettinen, 1980; Lütjohann *et al.*, 1995).

## **1.5 Wirkung der pflanzlichen Sterole und Stanole**

### **1.5.1 Die Cholesterolresorption**

Die Cholesterolresorption erfolgt im oberen Abschnitt des Dünndarms (Grundy & Mok, 1977; Heinemann *et al.*, 1991). Der gesamte Prozess lässt sich in eine extrazelluläre und eine intrazelluläre Phase gliedern. In der intrazellulären Phase wird das Cholesterol mit Hilfe des NPC1L1 durch die Membran der Darmepithelzellen geschleust, verestert und in Chylomikronen eingebaut, welche dann in die Lymphe abgegeben werden. Entscheidend für die Wirkung von Phytosterolen ist jedoch die extrazelluläre Phase. Diese spielt sich im Lumen des Duodenums und des proximalen Jejunums ab. Lipide, die aus der Nahrung stammen, werden durch Magen- und Pankreasenzyme gespalten und aggregieren mit der Hilfe von Gallensäuren zu gemischten Mizellen. Diese enthalten neben Cholesterol und Gallensäuren Phospholipide, Fettsäuren, Lyssolezithin sowie Mono- und Diglyzeride. Es handelt sich dabei um amphipolare Substanzen, die sich so zusammenlagern, dass die polaren Teile nach außen zum Darmlumen und die unpolaren Teile nach innen zeigen. Wichtig für die Löslichkeit von Sterolen in gemischten Mizellen ist die Art und Menge der jeweiligen Bestandteile. Schwarz *et al.* (1998) konnten zeigen, dass bei Mäusen mit einem Mangel an Cholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase nur eingeschränkt Gallensäuren gebildet werden können und die Cholesterolresorption damit nicht möglich ist. Nach der Fütterung dieser Mäuse mit

Cholsäure, welche die Mizellenbildung fördert, erreichte die Cholesterolresorption annähernd normale Werte. Auch bei Mäusen, bei denen die Galle nach außen abgeleitet wurde, war die Cholesterolabsorption extrem niedrig ( $< 7\%$ ) (Decker *et al.*, 1998). Die Cholesterolresorption sinkt ebenfalls, wenn der Gehalt an Phospholipiden im Darmlumen zu gering ist, oder wenn aufgrund eines defekten Enzyms Phosphatidylcholin anstelle von Lysophosphatidylcholin gebildet wird (Homan & Hamelhele, 1998; Voshol *et al.*, 1998).

Die Löslichkeit des Cholesterols in den Mizellen wird demnach von einem komplexen Wechselspiel der an der Bildung beteiligten Komponenten bestimmt. Da die pflanzlichen Sterole und Stanole ebenfalls zu diesen Komponenten gehören, sind sie in der Lage, die Polarität in den Mizellen zu verändern und somit die Löslichkeit des Cholesterols zu beeinflussen (Ikeda *et al.*, 1989; Heinemann *et al.*, 1991; Mel'nikov *et al.*, 2004). Die Stärke der Verminderung der Cholesterolabsorption hängt von der unterschiedlichen Löslichkeit der Sterole und Stanole in den Mizellen und ihrer Affinität zu den Mizellen ab (Hamada *et al.*, 2006).

Cholesterol und pflanzliche Sterole gelangen mit Hilfe des NPC1L1 in die Epithelzellen des Dünndarms. Dort sowie in der Leber, befinden sich die ABC-Transportproteine G5 und G8. Diese transportieren die Sterole unter ATP-Verbrauch wieder zurück in das intestinale Lumen bzw. in die Galle und beschränken somit die Resorption (Berge *et al.*, 2000). Aus der geringeren Affinität dieser Transporter für Cholesterol als für Phytosterole erklärt sich die höhere Resorptionsrate von Cholesterol.

Die Expression der Gene der ABC-Transportproteine stehen unter der Kontrolle der alimentären Zufuhr. Dies bedeutet, dass bei einer erhöhten Zufuhr von Cholesterol die Bildung dieser Proteine verstärkt wird, und die Cholesterolausscheidung somit steigt (Berge *et al.*, 2000). Da verschiedene Sterole diesen Transportweg nutzen, ergibt sich somit die Möglichkeit, durch eine hohe Zufuhr von Phytosterolen die intestinale Cholesterolresorption durch Aktivierung der ABC-Transportproteine zu senken. In vitro Studien bestätigen diese Möglichkeit (Plat & Mensink, 2002; Kaneko *et al.*, 2003). Bei Tierexperimenten konnte dieser Effekt jedoch nicht bewiesen werden (Field *et al.*, 2004; Plösch *et al.*, 2006).

### **1.5.2 Die cholesterolsenkende Wirkung der Phytosterole und Phytostanole**

Die Senkung der Cholesterolkonzentration im Plasma ist ein effektiver Weg, um das Risiko einer koronaren Herzkrankheit zu senken. Eine Verminderung der Cholesterolkonzentration um 10 %, senkt das Risiko einer koronaren Herzkrankheit bei 55 – 64-jährigen Männern im

Mittel um 38 % (Law *et al.*, 1994). Obwohl derzeit eine Vielzahl von cholesterolsenkenden Medikamenten zur Verfügung stehen, ist eine diätetische Behandlung von Personen mit einer milden Form der Hypercholesterolämie am bedeutensten. Phytosterole und –stanole stellen dabei eine mögliche, wirksame diätetische Komponente dar.

Peterson beschrieb 1951 erstmals, dass bei Küken ein durch cholesterolhaltiges Futter verursachter Anstieg der Plasma-Cholesterolkonzentration durch die Zugabe von Sterolen aus Sojabohnen vermindert werden kann. Seitdem wurden zahlreiche Studien zu der cholesterolsenkenden Wirkung von Phytosterolen und insbesondere von Sitosterol und Sitostanol durchgeführt. Pollak (1953) war der erste Forscher, der die hypocholesterolämische Wirkung von Sitosterol in Menschen demonstrieren konnte.

Bis in die 70er Jahre wurden große Mengen an pflanzlichen Sterolen (10 - 20 g/Tag) zur Senkung der Cholesterolkonzentration verabreicht. Aufgrund der großen Menge und des schlechten Geschmacks, kam es zu dieser Zeit jedoch nicht zu einer verbreiteten Nutzung dieser Komponenten. Lees *et al.* (1977) bewerteten daraufhin die effektive Dosis der Phytosterole neu und kamen zu dem Ergebnis, dass die maximale cholesterolsenkende Wirkung bei einer Dosis von 3 g/Tag erreicht wird. Hierbei kam es zu einer Reduktion des Gesamt-Cholesterols von 10 % und des LDL-Cholesterols von 15 % (Miettinen *et al.*, 1995; Nguyen, 1999). Heutzutage werden demnach nur noch etwa 2 - 3 g/Tag verabreicht (Katan *et al.*, 2003).

Mit steigendem Alter nimmt die absolute Senkung des LDL-Cholesterols zu (Law, 2000). Unterschiedliche Ergebnisse gibt es zu der Wirkung von Phytosterolen auf die Triglyzerid- und die HDL-Konzentration. Zahlreiche Studien zeigten keine signifikanten Veränderung bei der Aufnahme pflanzlicher Sterole (Vanhanen *et al.*, 1994; Miettinen *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997). Untersuchungen an Kindern zeigten jedoch eine Reduktion des HDL-Cholesterols um 12 % (Becker *et al.*, 1993). Bei erwachsenen Probanden ergab sich bei einer täglichen Zufuhr von 3 g Phytostanolestern eine Erhöhung um 11 % (Gylling & Miettinen, 1994).

Sugano *et al.* (1977) entdeckten erstmals, dass Stanole den LDL-Spiegel stärker senken als Sterole. Heinemann *et al.* (1991) wiesen nach, dass Sitosterol die Cholesterolabsorption um 50 % vermindert, während Sitostanol eine Hemmung von 85 % bewirkt. Eine Untersuchung an Kindern mit familiärer Hypercholesterolämie zeigte, dass eine tägliche Zufuhr von 6 g Sitosterol eine Senkung des LDL-Cholesterols von 20 % bewirkt. Mit einer Dosierung von 1.5 g Sitostanol pro Tag ergab sich eine Minderung von 33 % (Becker *et al.*, 1993). Als Ursache für die bessere Wirksamkeit der Stanole wird ein Unterschied in der Polarität und somit ein spezifischer Einfluss auf die Zusammensetzung der Mizellen genannt. Andere

Studien zeigten hingegen keinen Unterschied in der cholesterolsenkenden Wirkung von Phytosterolen und –stanolen (Weststrate & Meijer, 1998; Hallikainen *et al.*, 2000a). Die Reduktion des LDL-Spiegels lag sowohl bei der Zufuhr von Sterolester, als auch bei der Gabe von Stanolester Margarine zwischen 10 % und 13 %.

Durch die Zufuhr von Phytostanolen kann nicht nur die Cholesterolkonzentration im Plasma, sondern auch die Phytosterolkonzentration gesenkt werden (Vanhanen *et al.*, 1994; Miettinen *et al.*, 1995; Gylling *et al.*, 1999; Hallikainen *et al.*, 2000a). Auch bei Patienten mit Phytosterolämie konnte durch Sitostanolgabe eine Senkung der Phytosterolkonzentrationen erreicht werden (Lütjohann *et al.*, 1995). Aufgrund der geringeren Resorptionsrate der Phytostanole, steigt ihre Konzentration unter Phytostanolgabe auch nicht so stark an wie die Konzentration der Phytosterole bei der Gabe von Phytosterolen (Hallikainen *et al.*, 2000b).

Phytosterole und –stanole werden bevorzugt in veresterter Form verabreicht. Dadurch erhöht sich ihre Löslichkeit in Fett, und sie lassen sich leichter in Nahrungsmittel wie z.B. Margarine einbringen (Mattson *et al.*, 1982). Der Geschmack des angereicherten Produktes wird dadurch nicht verändert (Wester, 2000). Es muss jedoch erst eine enzymatische Hydrolyse durch die Cholesterol-Esterase des Pankreas erfolgen, damit die Phytosterole und –stanole das Cholesterol aus den Mizellen verdrängen können (Moreau & Hicks, 2004).

Wie bereits beschrieben, gibt es für die cholesterolsenkende Wirkung der Phytosterole und –stanole heutzutage mehrere Erklärungen. Zum einen beruht sie auf einer Beeinflussung der Mizellenzusammensetzung und der damit verbundenen Verminderung der Cholesterollöslichkeit. Dazu kommt die Möglichkeit einer Stimulation der Expression der Sterol-Efflux-Transporter. Zudem resultiert eine geringere Cholesterolresorption in einer verminderten Konzentration an zirkulierendem Cholesterol. Dies hat eine erhöhte endogene Cholesterolsynthese sowie eine vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren zur Folge (Plat & Mensink, 2005).

Der Effekt von Phytosterolen und –stanolen auf die Arteriosklerose wurde in Tierversuchen erforscht. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der arteriellen Lipid-Akkumulation bei Kaninchen, transgenen Mäusen und Hamstern (Ikeda *et al.*, 1981; Moghadasian *et al.*, 1997; Ntanos *et al.*, 1998; Volger *et al.*, 2001; Plat *et al.*, 2006). Der Zurückgang einer bereits entstandenen Arteriosklerose konnte bisher nicht beobachtet werden (Moghadasian *et al.*, 1999a). Bei Kaninchen mit einer durch eine atherogene Diät verursachten Erhöhung der Serum-Cholesterolkonzentration konnte durch die Fütterung von 0.64 g Phytostanolen pro

Tag die Entstehung von arteriellen Plaques vermindert werden (Ntanos *et al.*, 1998). Sitostanol hatte bei Kaninchen einen stärkeren präventiven Effekt als Sitosterol (Ikeda *et al.*, 1981).

### 1.5.3 Nebenwirkungen von Phytosterolen und Phytostanolen

Die US Food and Drug Administration (FDA) hat Nahrungsmittel, in denen Phytosterole oder Phytostanole enthalten sind, als sicher erklärt. Zahlreichen Studien zufolge ist bei der Anreicherung von Lebensmitteln mit pflanzlichen Sterolen oder Stanolen mit keinen gesundheitsschädigenden Nebenwirkungen zu rechnen (Ayesh *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 1999; Hepburn *et al.*, 1999; Waalkens-Berendsen *et al.*, 1999; Weststrate *et al.*, 1999; Sanders *et al.*, 2000; Wolfreys & Hepburn, 2002; Lea *et al.*, 2004; Lea & Hepburn, 2006). Zudem wird schon seit dem Jahr 1995 in Finnland eine mit Stanolestern angereicherte Margarine verkauft, ohne dass bis jetzt Berichte über unerwünschte Wirkungen zu Tage gekommen sind (Plat & Mensink, 2005). Von Phytosterolen geht keine östrogene Wirkung aus (Baker *et al.*, 1999) und sie sind nicht teratogen (Slesinski *et al.*, 1999). Die bakterielle Zusammensetzung und die Aktivität der Darmflora werden durch Phytosterole oder -stanole nicht beeinflusst (Ayesh *et al.*, 1999).

Möglich ist jedoch ein Einfluss der Phytosterole und -stanole auf die Resorption anderer lipophiler Substanzen der Nahrung wie z.B. fettlösliche Vitamine. Es konnte gezeigt werden, dass die Plasmakonzentration des  $\beta$ -Carotins um bis zu 25 % und die von Vitamin E um 8 % sinkt. Die Vitamin D-Konzentration blieb hingegen unverändert (Law, 2000). Der Senkung des  $\beta$ -Carotinspiegels kann jedoch durch eine adäquate Aufnahme von Früchten und Gemüse vorgebeugt werden.

Auch ist bekannt, dass Phytosterole und -stanole in Zellmembranen eingebaut werden können. Da sie schlechter mit Phospholipiden interagieren als das Cholesterol, kann es zu Veränderungen der Membrancharakteristik kommen (Halling & Slotte, 2004). In einer Studie von Ratnayake *et al.* (2000) wurde eine verkürzte Lebensspanne der Erythrozyten von mit pflanzlichen Sterolen gefütterten Ratten festgestellt. Als Grund wird ein Austausch des Cholesterols in der Membran durch pflanzliche Sterole genannt, wodurch die Zellen weniger deformierbar und somit empfindlicher werden. Auch bei Phytosterolämiepatienten konnte aufgrund erhöhter Phytosterolkonzentrationen in der Erythrozytenmembran eine verstärkte Hämolyse festgestellt werden (Wang *et al.*, 1981).

Lange Zeit galt die Annahme, dass Phytosterole und –stanole nicht in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten. Sogar bei Patienten mit Phytosterolämie wurden im Vergleich zu anderen Organen nur geringe Mengen von Campesterol und Sitosterol im Gehirn nachgewiesen (Salen *et al.*, 1992). Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass pflanzliche Sterole bei Mäusen in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und im Gehirn zu akkumulieren (Jansen *et al.*, 2006; Thelen *et al.*, 2006b). Ob es dadurch zu einer Beeinflussung der Gehirnfunktion kommt, ist noch nicht bewiesen.

Bei gesunden Menschen werden pflanzliche Sterole und Stanole nur in sehr geringen Mengen resorbiert. Patienten mit Phytosterolämie, bei denen die Resorption und somit der Gehalt an Phytosterolen im Plasma stark ansteigt, haben ein erhöhtes Risiko für eine koronare Herzkrankheit. Man könnte somit annehmen, dass hohe Konzentrationen an pflanzlichen Sterolen atherogen sind (Miettinen, 1980; Salen *et al.*, 1992; Plat & Mensink, 2005). Zudem konnten bei Personen mit einem erhöhten Risiko für eine koronare Herzkrankheit, im Plasma höhere Campesterol- und Sitosterolkonzentrationen festgestellt werden als bei Probanden ohne ein erhöhtes Risiko (Glueck *et al.*, 1991; Sudhop *et al.*, 2002a). Kürzlich durchgeführte Studien zeigen jedoch, dass leicht erhöhte pflanzliche Sterole im Blut keinen Risikofaktor für eine koronare Herzkrankheit darstellen (Fassbender *et al.* 2006; Pinedo *et al.* 2007).

Eine vermehrte Aufnahme von Stanolen senkt die Plasma-Sterolkonzentration (Vanhanen *et al.*, 1994; Miettinen *et al.*, 1995). Zudem werden Stanole aufgrund ihrer geringen Resorbierbarkeit sowie ihrer Stabilität gegen Oxidation und enzymatischen Veränderungen als sicherer angesehen als pflanzliche Sterole (Wester, 2000).

Bisher stehen Ergebnisse von Studien mit Phytosterolen und –stanolen von über 5 Jahren zur Verfügung und das Verhältnis von Risiko und Nutzen scheint günstig zu sein. Man muss jedoch bedenken, dass bisher noch keine Langzeiterfahrungen vorliegen.

## **1.6 Problemstellung und Ziel der Arbeit**

Herz-Kreislauf Erkrankungen zählen neben den Infektionskrankheiten weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Im Jahre 2005 starben in Deutschland 367.361 Menschen in Folge von Erkrankungen des Kreislaufes, das entspricht fast 45 % der Todesfälle (Statistisches Bundesamt, 2005). Die meisten dieser Fälle werden durch Arteriosklerose verursacht. Einer der Risikofaktoren für Herz-Kreislauf Erkrankungen ist neben Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nikotinkonsum eine erhöhte Plasmakonzentration von Gesamt- und LDL-



Cholesterol. Verschiedene Leitlinien, wie die *European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice* oder *Adult Treatment Panel III* betonen, dass die Senkung der LDL-Cholesterolkonzentration eine wichtige Rolle bei der Reduktion des kardiovaskulären Risikos darstellt (NCEP 2002; Pearson *et al.*, 2002; De Backer *et al.*, 2003; Grundy *et al.*, 2004). Beispielsweise konnte eine Senkung der Gesamt-Cholesterolkonzentration um 10 % bei 55 – 64-jährigen Männern, die Inzidenz ischämischer Herzkrankheiten im Mittel um 38 % senken (Law *et al.*, 1994).

Anhand dieser Zahlen wird die Notwendigkeit der Prävention und Therapie kardiovaskulärer Krankheiten deutlich. Hierbei spielt die Bekämpfung der Hypercholesterolämie eine entscheidende Rolle. Zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen werden häufig Statine, Ezetimib oder Gallensäuren-bindende Harze eingesetzt (Sudhop & von Bergmann, 2002). Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase und vermindern somit die Neusynthese von Cholesterol, während Ezetimib die Resorption von Cholesterol im Darm hemmt, indem es den Niemann-Pick C1 Like1 Transporter blockiert. Gallensäuren-bindende Harze erhöhen die fäkale Ausscheidung von Gallensäuren und fördern somit den Cholesterolabbau zu Gallensäuren.

Neben der medikamentösen Therapie ist eine geeignete Ernährung ein wichtiger Punkt, und bei milden Formen der Hypercholesterolämie auch oft ausreichend, um erhöhte Plasma-Cholesterolkonzentrationen zu senken. Seit einigen Jahren sind verschiedene Lebensmittel, wie Margarine oder Milch und Milchprodukte auf dem Markt, die mit pflanzlichen Sterolen oder Stanolen angereichert wurden, um die Cholesterolresorption im Darm zu vermindern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung des Nutzens und der Risiken einer erhöhten Zufuhr von Phytosterolen und Phytostanolen. Hierbei werden drei Schwerpunkte gesetzt:

- Zum einen wird die Wirkung einer erhöhten Zufuhr pflanzlicher Sterole und Stanole auf die Zirkulation überprüft, d.h. der Einfluss pflanzlicher Sterole/Stanoole auf den Cholesterolstoffwechsel im Plasma und in der Leber. Es wird untersucht, ob es hierbei einen Unterschied in der Wirkung bei und ohne eine alimentäre Zufuhr von Cholesterol gibt. Zudem wird die Verteilung und Akkumulation des Cholesterols und der pflanzlichen Sterole und Stanole im Plasma und in der Leber sowie die Ausscheidung dieser Substanzen über die Galle beobachtet.

- Da Patienten mit Phytosterolämie ein erhöhtes Risiko für eine koronare Herzkrankheit haben, stellt sich schon seit langem die Frage, ob eine erhöhte Phytosterolkonzentration im Plasma die Entstehung einer Arteriosklerose begünstigen kann (Sudhop *et al.*, 2002a; Assmann *et al.*, 2006). Andere Studien hingegen beweisen, dass durch die Zufuhr von Phytosterolen und –stanolen eine Verminderung der arteriellen Lipidakkumulation erreicht wird. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist somit die Untersuchung der Ausprägung der Arteriosklerose bei heterozygoten und homozygoten WHHL-Kaninchen, mit und ohne cholesterolreiche Nahrung, bei einer zusätzlichen Fütterung von pflanzlichen Sterolen/Stanolene.
- Da kürzlich bei Mäusen entdeckt wurde, dass Phytosterole die Blut-Hirn-Schranke überwinden und somit einen möglichen Einfluss auf die Cholesterolsynthese und den Cholesterolgehalt des Gehirns ausüben könnten (Jansen *et al.*, 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob pflanzliche Sterole und Stanole auch bei Watanabe Kaninchen in das Gehirn gelangen können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

#### **2.1.1 NOFORISK**

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des EU-Projektes „Quantitative risk assessment strategies for novel foods“ (NOFORISK). Ziel dieses Projektes war die Entwicklung und Validierung von wissenschaftlichen Methoden, die für die Risiken- und Nutzenabschätzung der in der EU vermarkteten „second generation“ der Novel Foods notwendig sind.

Die Finanzierung erfolgte durch das „Sixth Framework Programm, EU“. Beteiligt waren Forschungs-Teams aus zehn verschiedenen Ländern.

Die Methodenentwicklung und –validierung wurde am Beispiel von drei verschiedenen Lebensmitteln bzw. Lebensmittelinhaltsstoffen durchgeführt:

- einer genetisch modifizierten Kartoffel mit verändertem Toxingehalt (Glycoalkaloide,  $\alpha$ -Solanin)
- konventionell erzeugtem Reis mit vermindertem Phytinsäuregehalt sowie
- zwei „Functional Food“-Inhaltsstoffen (Phytosterole und -stanole).

Das Projekt gliederte sich in 7 Workpackages, in denen jeweils ein Teilaspekt behandelt wurde. Die Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn war an dem Workpackage 4: „Combined safety, nutrition and health promotion studies in animal models“ beteiligt. Die Aufgabe war die Untersuchung des Nutzens und der Risiken einer erhöhten Zufuhr von pflanzlichen Sterolen und Stanolen. Hierzu erfolgte eine Fütterung von unterschiedlichen Mengen an Phytosterolestern bzw. Phytostanolestern in Kombination mit Cholesterol, an heterozygote und homozygote Watanabe Kaninchen.

Die Studie gliederte sich in zwei Teile: Zwei Pilotstudien sowie zwei Hauptstudien.

### **2.1.2 Design der Pilotstudien**

Im Zeitraum von August 2004 bis Dezember 2004 erfolgten die zwei Pilotstudien, die zur Ermittlung der Dosierung des Cholesterols und der pflanzlichen Stanole bzw. Sterole der Hauptstudien dienen sollten. Die Watanabe Kaninchen stammen aus der Haus-Zucht des Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soeborg, Dänemark. Die Paarung wurde am 21. und 22. Februar 2004 vorgenommen und die Geburt der Kaninchen erfolgte dann zwischen dem 25. und 27. März 2004. Am 20. und 21. April 2004 wurden den Kaninchen Blutproben zur Messung der Plasma-Cholesterol- und Triglyzeridkonzentrationen entnommen, um festzustellen, welche Tiere homozygot und welche heterozygot waren. Eine zweite Kontrolle erfolgte am 2. und 3. Mai. Zu Beginn der Studien waren die Tiere 6 Wochen alt.

Die Kaninchen wurden in separaten Käfigen gehalten und die Vorschriften für eine artgerechte Haltung von Labortieren befolgt.

#### **Design der ersten Pilotstudie – 19 Tage**

In dieser 19-tägigen Vorstudie wurden die Untersuchungen an 30 weiblichen WHHL-Kaninchen durchgeführt (Körpergewicht:  $1230 \pm 47.3$  g). Davon waren 15 homozygot (HH) und 15 heterozygot (hH). Die Studie umfasste fünf Gruppen mit jeweils sechs Tieren (3HH, 3hH). Von Tag 1 bis Tag 3 erhielten die Kaninchen ein Standard Futter (Altromin 2123, Brogaarden, Dänemark). An den restlichen 16 Tagen bekamen die Tiere dann ein gruppenspezifisches Spezial Futter (Tab. 2.1). Hierbei wurden unterschiedliche Mengen an Sterol- bzw. Stanolestern (Firma Raisio, Finnland), die aus Rapsöl stammten, in Kombination mit Cholesterol (Sigma C8503) in die Standard Diät Altromin 2123 gemischt. Die Kaninchen hatten freien und unbegrenzten Zugang zu Wasser.

Tabelle 2.1. Gruppeneinteilung der 19-Tages-Studie

Gruppe	Tier Nr.	Genotyp	Futter
1	1 – 3	3 hH	0.4 % Rapsöl + 0.1 % Cholesterol
	4 – 6	3 HH	
2	7 – 9	3 hH	1.0 % Sterolester* + 0.1 % Cholesterol
	10 – 12	3 HH	
3	13 – 15	3 hH	0.25 % Stanolester* + 0.1 % Cholesterol
	16 – 18	3 HH	
4	19 – 21	3 hH	0.5 % Stanolester* + 0.1 % Cholesterol
	22 – 24	3 HH	
5	25 – 27	3 hH	1.0 % Stanolester* + 0.1 % Cholesterol
	28 – 30	3 HH	

hH = heterozygot, HH = homozygot, \* aus Rapsöl stammend

Die Fütterung erfolgte täglich um 14 Uhr. Die Futteraufnahme wurde durch Wiegen der Reste des Vortages kontrolliert, bevor die Tiere eine neue Portion erhielten. Sie lag bei 100 g/Tag. Das Körpergewicht der Kaninchen betrug am Ende der Studie durchschnittlich  $1669 \pm 42.1$  g. Den Kaninchen wurde an Tag 1 und 19 Blut zur Kontrolle der Plasma-Cholesterolkonzentration, dessen Vorstufe Lathosterol sowie der Konzentrationen der pflanzlichen Sterole bzw. Stanole entnommen. Zudem wurden nach der Tötung der Tiere Proben der Galle, der Leber, des Gehirns und der Intima der Aorta auf diese Parameter hin untersucht.

### Design der zweiten Pilotstudie - 28 Tage

Diese Studie ging über 28 Tage, und es waren 36 WHHL-Kaninchen beider Geschlechter daran beteiligt (Körpergewicht:  $1282 \pm 169$  g) (Tab. 2.2). Es wurde eine Unterteilung in drei Gruppen mit jeweils zwölf Tieren vorgenommen. Jeweils sieben davon waren heterozygot und fünf homozygot. Die Kaninchen bekamen 28 Tage lang kein, bzw. 0.1 % oder 0.2 % Cholesterol (Sigma C 8503) in ihr Futter (Altromin 2123) gemischt.

Tabelle 2.2. Gruppeneinteilung der 28-Tages Studie

Gruppe	Tier Nr.	Genotyp	Futter
1	1-7	hH	Kontrolle
	8-12	HH	
2	3-19	hH	+ 0.1 % Cholesterol
	20-24	HH	
3	25-31	hH	+ 0.2 % Cholesterol
	32-36	HH	

hH = heterozygot, HH = homozygot

Die täglich aufgenommene Futtermenge betrug 100 g/Tag. Die Kaninchen wogen nach 28 Tagen durchschnittlich  $1946 \pm 160$  g. Die Blutentnahme erfolgte an Tag 1 und an Tag 28 zur Bestimmung der Cholesterol-, Lathosterol- sowie der Sterol- und Stanolkonzentration im Plasma. Nach dem Tod wurden auch in dieser Studie Proben der Galle, der Leber, des Gehirns sowie der Intima der Aorta entnommen und untersucht.

### 2.1.3 Design der Hauptstudien

Es gab zwei Hauptstudien. In der ersten wurden Untersuchungen an homozygoten und in der zweiten Studie Untersuchungen an heterozygoten WHHL-Kaninchen durchgeführt. Die beiden Hauptstudien fanden jeweils in zwei Phasen statt, da nur eine begrenzte Kapazität für die Haltung der Tiere vorhanden war. Die Paarung für die erste Phase erfolgte am 21. und 22. Februar 2005 und alle Tiere wurden zwischen dem 25. und 27. März 2005 geboren. Am 20. und 21. April 2005 wurden den Kaninchen Blutproben zur Bestimmung des Genotyps entnommen. Eine zweite Kontrolle erfolgte am 2. und 3. Mai 2005. Start des Untersuchungszeitraumes war der 9. Mai 2005. Die zweite Phase begann am 4. Oktober 2005, nachdem diesen Kaninchen ebenfalls nach der vierten und fünften Woche ihres Lebens Blutproben zur Bestimmung des Genotyps entnommen wurden.

Die beiden Phasen der Untersuchung an homozygoten Kaninchen dauerten jeweils 120 Tage. Bei den heterozygoten Tieren erstreckte sich die erste Phase über 120 und die zweite Phase über 150 Tage, da man versuchte, die in der ersten Phase gefundenen Effekte der Cholesterol- und Sterol-/Stanolfütterung, durch Verlängerung der Studie um 30 Tage zu intensivieren.

### Design der ersten Hauptstudie – Homozygote Watanabe Kaninchen

An dieser Studie nahmen in der ersten Phase 36 und in der zweiten Phase 35 homozygote Watanabe Kaninchen beider Geschlechter teil (Tab. 2.3). Es gab eine Unterteilung in vier Gruppen mit jeweils neun Tieren. Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe und erhielt ein Standard Futter (Altromin 2123) (Körpergewicht:  $865 \pm 77.6$  g) und die zweite eine Diät mit 1.7 % Stanolestern (Firma Raisio, Finnland) ( $963 \pm 155$  g). Gruppe drei bekam das Futter mit 3.4 % Stanolestern versetzt ( $964 \pm 137$  g) und die vierte Gruppe mit 3.4 % Sterolestern ( $972 \pm 126$  g).

Tabelle 2.3. Gruppeneinteilung der ersten Hauptstudie mit homozygoten WHHL-Kaninchen

Gruppe	Tier Nr.		Futter
	Phase I	Phase II	
1	1 - 9	37 - 45	Standard Futter
2	10 - 18	46 - 54	+ 1.7 % Stanolester*
3	19 - 27	55 - 63	+ 3.4 % Stanolester*
4	28 - 36	64 - 71	+ 3.4 % Sterolester*

\* aus Rapsöl stammend

Zweimal täglich wurde nach dem Wohlbefinden der Tiere geschaut und sie wurden einmal wöchentlich gewogen. Die täglich aufgenommene Futtermenge lag bei 100 g/Tag. Die Tiere der Kontrollgruppe (Standard Futter) wogen am Ende der Studie  $2620 \pm 151$  g, die Tiere der 1.7 % Stanolestergruppe  $2656 \pm 124$  g. Bei den Tieren, die 3.4 % Stanolester bekamen, betrug das Gewicht  $2696 \pm 167$  g und in der 3.4 % Sterolestergruppe  $2730 \pm 177$  g.

Blutproben zur Bestimmung der Cholesterol-, Lathosterol- und der Phytosterol- und -stanolkonzentration im Plasma wurden an Tag 1 und an Tag 120 entnommen. Am Ende der Studie erfolgte nach der Tötung der Tiere wieder die Entnahme von Proben der Galle, der Leber, der Intima der Aorta sowie des Gehirns.

### Design der zweiten Hauptstudie - Heterozygote Watanabe Kaninchen

In der ersten Phase wurden 36 und in der zweiten Phase 35 heterozygote Kaninchen beider Geschlechter untersucht (Tab. 2.4). Wie in der ersten Hauptstudie, erfolgte auch hier eine Unterteilung in vier Gruppen, und die Tiere bekamen ebenfalls unterschiedliche Mengen an Sterol- bzw. Stanolestern in ihr Futter (Altromin 2123) gemischt. Zusätzlich wurde das Futter der Tiere dieser Studie noch mit 0.2 % Cholesterol (Sigma C8503) versetzt (Körpergewicht: 0.2 % Cholesterol =  $965 \pm 142$  g, 0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester =  $981 \pm 155$  g, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester =  $1003 \pm 155$  g, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester =  $1040 \pm 187$  g).

Tabelle 2.4. Gruppeneinteilung der zweiten Hauptstudie mit heterozygoten WHHL-Kaninchen

Gruppe	Tier Nr.		Futter
	Phase I	Phase II	
1	1 - 9	37 - 45	+ 0.2 % Cholesterol
2	10 - 18	46 - 54	+ 1.7 % Stanolester* + 0.2 % Cholesterol
3	19 - 27	55 - 62	+ 3.4 % Stanolester* + 0.2 % Cholesterol
4	28 - 36	63 - 71	+ 3.4 % Sterolester* + 0.2 % Cholesterol

\* aus Rapsöl stammend

Auch hier wurde zweimal täglich nach dem Wohlbefinden der Tiere geschaut und wöchentlich das Gewicht kontrolliert. Die aufgenommene Futtermenge lag ebenfalls bei 100 g/Tag. Das Körpergewicht stieg bis zum Ende der Studie in den einzelnen Gruppen auf  $2856 \pm 183$  g,  $2837 \pm 127$  g,  $2795 \pm 151$  g und  $2836 \pm 202$  g.

Blutproben wurden in der ersten Phase an Tag 1 und 120 und in der zweiten Phase an Tag 1, 120 und 150 entnommen. Zudem erfolgte am Ende der Studie nach der Tötung der Kaninchen die Entnahme und Analyse von Proben der Galle, der Leber, der Intima der Aorta und des Gehirns.



## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Gewinnung der Proben**

Die Kaninchen wurden mit 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital über eine intravenöse Injektion in die marginale Ohrvene, bis zur vollkommenen Bewusstlosigkeit anästhesiert. Als Kontrolle diente der Verlust des Augenreflexes. Danach wurden die Tiere ausgeblutet. Die Spülung des arteriellen Systems erfolgte über eine Kanüle, welche in die linke Herzkammer eingeführt wurde, mittels 300 ml gekühlter Kochsalzlösung (0.9 %).

#### **Entnahme der Blutproben**

An Tag 1 vor der Fütterung und am letzten Tag der jeweiligen Studie, wurden 2 ml des Blutes in mit Heparin beschichtete Röhrchen gegeben und bei 3000 U/min für 15 min zentrifugiert. Danach wurde das Plasma bei  $-20\text{ C}^\circ$  bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

#### **Gewinnung der Galle und Präparation der Leber**

Die Leber wurde zusammen mit der Gallenblase entfernt. Mit Hilfe einer Spritze entnahm man die größtmögliche Menge an Galle aus der Gallenblase. Die Galle wurde danach unverzüglich bei  $-20\text{ C}^\circ$  eingefroren.

Von der Leber wurde nach der Entfernung der Gallenblase das exakte Gewicht notiert und von dem linken Leberlappen eine Gewebeprobe abgetrennt. Diese wurde gewogen und ebenfalls bei  $-20\text{ C}^\circ$  gefroren.

#### **Präparation des Gehirns**

Das Gehirn wurde vollständig entnommen und gewogen. Von der rostralen rechten Hälfte entnahm man eine Gewebeprobe, die dann gewogen und anschließend bei  $-20\text{ C}^\circ$  eingefroren wurde.

#### **Präparation der Aorta**

Die Aorta wurde in der gesamten Länge, vom Herzen bis zu der Verzweigung der beiden großen Beckenarterien, entnommen und von Fett und Bindegewebe gereinigt. Am oberen Abschnitt der aufsteigenden Aorta wurde ein Stück der Intima von dem Rest der Aortenwand getrennt, gewogen und eingefroren.

## 2.2.2 Materialien

### Instrumentelle Ausstattung

- Analytische Waage (Sartorius MC-5, Sartorius AG, Göttingen)
- Spatel
- Vortex Mixer
- Pipetten (50, 100 und 1000  $\mu$ l, Fa. Eppendorf)
- Reagenzgläser mit teflonbeschichteten Septen und Schraubverschluss (10 ml)
- GC-Vials (2 ml) mit Mikroinsätzen (300  $\mu$ l) für den Autosampler (VWR International, Darmstadt)
- Temperaturregulierter Heizblock mit Stickstoff-Abdampfvorrichtung (P.Fastnacht, Bonn)
- Zentrifuge (Varifuge 3.OR, Fa. Heräus)
- Glaspasteurpipetten
- Temperaturreguliertes Wasserbad (GFL)
- Automatic Environmental Speedvac AES 1000 (SAVANT Instruments Inc., Framingdale, USA)
- Olympus Mono Okular Mikroskop
- GC und GC/MS s.2.2.5 und 2.2.6 (Agilent Technologies)

### Reagenzien

- 5 $\alpha$ -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 1 mol/L (90 % Ethanol) (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Ethanol (Merck, KGaA, Darmstadt)
- MeOH (Merck, KGaA, Darmstadt)
- Epikoprostanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Cholesterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Campesterol/Sitosterol (40:60; w/w) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)

- 
- Stigmasterol (Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg)
  - Brassicasterol (Fytokem Products, Kanada)
  - Campestanol/Sitostanol (20:80;w/w) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
  - Lathosterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
  - 0.9 %ige NaCl-Lösung (Delta Select, Pfullingen)
  - 4 %iges Formaldehyd
  - Paraffin Wachs
  - Orcein
  - Hämatoxilin und Pikrinsäure-Säurefuchsin (van Gieson Färbung)

### 2.2.3 Aufarbeitung von Plasmaproben und Galle

Das Verfahren geht auf eine in unserem Labor etablierte und laut Good Laboratory Practice (GLP) in einer Standard Operation Procedure (SOP) abgelegten Methode zurück (Lütjohann *et al.*, 2002; Thelen *et al.*, 2006a).

Durch die alkalische Hydrolyse werden die im Plasma hauptsächlich als Ester vorliegenden Sterole freigesetzt. Bei der Extraktion werden sie von den anderen Stoffgruppen getrennt und zur gaschromatographischen und massenspektrometrischen Analyse durch Derivatisierung in eine leicht flüchtige Form gebracht.

- 50 µl der Probe wurden zusammen mit 10 µl Epikoprostanol und 50 µl 5 $\alpha$ -Cholestan (interne Standards) in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert.
- Alkalische Hydrolyse: Es erfolgte die Zugabe von 1 ml 1N ethanolischer NaOH. Die Röhrchen wurden fest verschlossen und für 1 Stunde bei 65 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Dadurch wurden die im Serum enthaltenen Proteine denaturiert, proteingebundene Lipide freigesetzt und Esterbindungen hydrolysiert.
- Extraktion: Den Proben wurde 500 µl Aqua dest. und 3 ml Cyclohexan zugesetzt. Dann wurde 30 sek. geschüttelt (Vortex-Mischer). Durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 2000 U/min erfolgte die Trennung der Phasen. Die obere hydrophobe Phase wurde danach in ein separates Röhrchen überführt. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt, sodass die Lipide dann in 6 ml Cyclohexan vorlagen.

- Die gewonnene Cyclohexanphase wurde nun unter N<sub>2</sub> bei 65 °C vollständig eingedampft, der Rückstand in 100 ml n-Decan aufgenommen und jeweils 50 µl davon in ein Chromatographiegefäß (GC-Vial) überführt. Den Proben, welche nur mit dem GC/FID gemessen wurden, wurde nochmals 300 µl n-Decan zugesetzt.
- Derivatisierung: Zu den Proben wurde 20 µl (GC/MS) bzw. 50 µl (GC) eines Derivatisierungsreagenz gegeben. Dabei handelte es sich um ein Gemisch aus Pyridin, Hexamethyldisilazan und Chlortrimethylsilan im Verhältnis 9:3:1. (v/v/v). Die Vials wurden verschlossen und anschließend für 1 Stunde auf einer Heizplatte bei 70 °C inkubiert. Dabei wurden die Hydroxylgruppen der Sterole und Stanole zu Trimethylsilythern derivatisiert.

Proben, bei denen die Konzentration an Cholesterol, Sterolen oder Stanolen außerhalb des linearen Bereichs der Eichgeraden lag (siehe 2.2.6), wurden 1:100 mit einer 0.9 %igen NaCl-Lösung verdünnt und 200 µl davon erneut aufgearbeitet.

#### **2.2.4 Aufarbeitung von Gewebeproben**

Die Gewebe wurden gewogen und anschließend im Savant getrocknet. Danach wurde das Trockengewicht der Proben ermittelt und je nach Gewebe 3, 4 oder 5 ml einer Chloroform/Methanol-Lösung (2:1, v/v) dazugegeben. Dies wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden wieder in Abhängigkeit des zu untersuchenden Gewebes 100 – 300 µl des Gemisches abgenommen und unter N<sub>2</sub> eingedampft. 50 µl 5 $\alpha$ -Cholestan und 10 µl Epikoprostanol wurden als interne Standards dazugegeben und die weitere Aufarbeitung erfolgte dann wie bei Plasmaproben mit alkalischer Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung (siehe 2.2.3).

### 2.2.5 Gaschromatographische Analyse

Da Cholesterol in biologischen Materialien in relativ hohen Konzentrationen vorliegt, ist dessen Bestimmung mit einem geringen Aufwand verbunden. In den meisten Routinelaboratorien erfolgt die Konzentrationsmessung mit Hilfe eines enzymatischen Tests. Für die Bestimmungen von Sterolen und Stanolen, die in rund 1000-fach geringeren Konzentrationen in den Proben vorliegen, sind jedoch aufwendigere analytische Verfahren notwendig. Die verschiedenen Substanzen müssen zuverlässig und reproduzierbar voneinander getrennt und einzeln quantifiziert werden. Die Gaschromatographie hat sich hierbei als Standardverfahren etabliert (Fenton, 1992). Bei dieser Methode der Chromatographie besteht die mobile Phase aus einem Gas. Dieses Gas wird durch eine hohle Säule mit einem definierten Innendurchmesser geleitet, die mit einem bestimmten Material ausgekleidet ist, der stationären Phase.

Zu Beginn wird das Probengemisch, um eine vollständige Verdampfung der Probe zu gewährleisten, durch einen Injektor bei 280 °C auf die Säule gebracht. Die Geschwindigkeit, mit der sich die zu analysierenden Stoffe in diesem System bewegen, hängt von dem Maß der Wechselwirkungen ab, die sie mit der stationären Phase eingehen. Substanzen mit einer niedrigen Affinität zur stationären Phase, bewegen sich somit schneller als Substanzen mit hoher Affinität. Die Zeit, die eine Substanz benötigt um die Trennstrecke zu durchlaufen, bezeichnet man als Retentionszeit. Die Identifizierung der Substanz erfolgt dann alleine über den Vergleich der Retentionszeit mit zertifizierten Substanzen (Tab. 2.5). Da man nicht ausschließen kann, dass verschiedene Substanzen mit gleichen Retentionszeiten miterfasst werden, stellt dies eine relativ unselektive und unspezifische Methode dar. Aufgrund der normalerweise geringen Konzentration der Sterole und Stanole im Plasma und in den Geweben, spielt dieser Faktor für das Cholesterol aber keine Rolle. Verlässt eine Substanz die Trennsäule, so schaltet sich der Flammenionisationsdetektor an. Dieser liefert ein der Substanzmenge entsprechendes Signal („Peak“), welches er an einen Computer mit entsprechender Software weiterleitet.

Zur Quantifizierung der Zielsubstanz wird die Fläche der Peaks herangezogen. Dieser Wert wird in Relation zur Fläche eines internen Standards gesetzt. Bei den Messungen am GC/FID wurde 5 $\alpha$ -Cholestan als interner Standard verwendet. Für die Validierung der Einpunkt-Eichmethode mit 5 $\alpha$ -Cholestan als internem Standard, wurden die Ergebnisse der Plasmakonzentrationen des Cholesterols einer Einpunkt-Eichung, mit einer Eichgerade

verglichen. Abbildung 2.1 zeigt die Eichkurve für Cholesterol mit 5 $\alpha$ -Cholestan als internem Standard.

Zur Überprüfung der Präzision der Methode wurde die gleiche Serumprobe sechsfach aufgearbeitet und gemessen. Zudem wurde eine aufgearbeitete Probe sechsmal hintereinander injiziert, um die Stabilität des Gerätes 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).

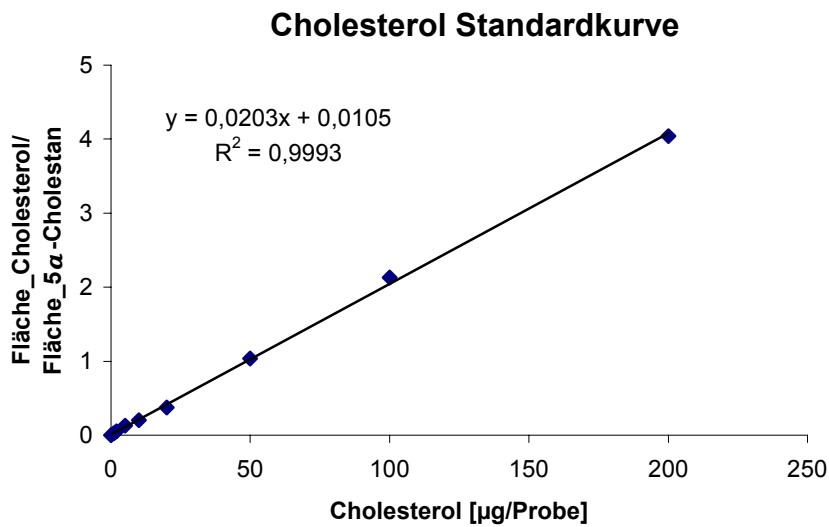
Die Nachweisgrenze einer Substanz ermittelt man durch Gegenüberstellung bekannter niedriger Lösungen des Analysaten mit substanzfreiem Medium, wobei man die geringste Konzentration ermittelt, bei der der Analysat gerade noch erfasst werden kann. Ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 wird zur Bestimmung der Nachweisgrenze akzeptiert (Kromidas, 1999). Die Nachweisgrenze für Cholesterol bei der GC/FID-Methode, wird auf 0.1 mg/dl, durch den niedrigsten Punkt der Eichkurve festgelegt.

Für die Bestimmungsgrenze in biologischen Matrices wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 festgelegt. Der Einfluss der chromatographischen Basislinie kann für das Cholesterol vollständig vernachlässigt werden. 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.

Wie schon erwähnt, wurde mit Hilfe der weniger spezifischen und selektiven Flammenionisationsdetektion, die Cholesterolkonzentration der Proben bestimmt. Zur Bestimmung des Gehaltes an pflanzlichen Sterolen und Stanolen, die normalerweise in rund 1000-fach geringeren Konzentrationen in der Probe vorliegen können als das Cholesterol, wurde das gaschromatographische Trennverfahren an die hochspezifische massenselektive Detektion (GC/MSD) gekoppelt (siehe 2.2.6).

Tabelle 2.5. Retentionszeiten der analysierten Sterole

<b>Substanz</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>
5 $\alpha$ -Cholestan	Interner Standard	11.80
Cholesterol	Sterol	15.10



**Abbildung 2.1:** Eichkurve für Cholesterol mit 5 $\alpha$ -Cholestan als internem Standard

### Bedingungen

Die Analyse der aufgearbeiteten Proben erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

Säule:

DB-XLB column (J & W Scientific);

Länge: 30 m

Durchmesser: 0.25 mm

Filmdicke: 0.25 µm

Mobile Phase:

Trärgas: Wasserstoff

Fluss: 1.1 ml/min

Injektor:

Hewlett-Packard (HP) 7683

Modus: Pulsed splittlos

Injektionsvolumen: 2 µl

Injektortemperatur: 280 °C

Ofen:

Hewlett Packard (HP) 6890

Anfangstemperatur: 150 °C

Dauer: 3 min

Endtemperatur: 290 °C

Heizrate: 30 °C/min

Dauer: 14.33 min

Peak-Flächen-Integration:

HP GC ChemStation Software Version Rev.A. 08.03

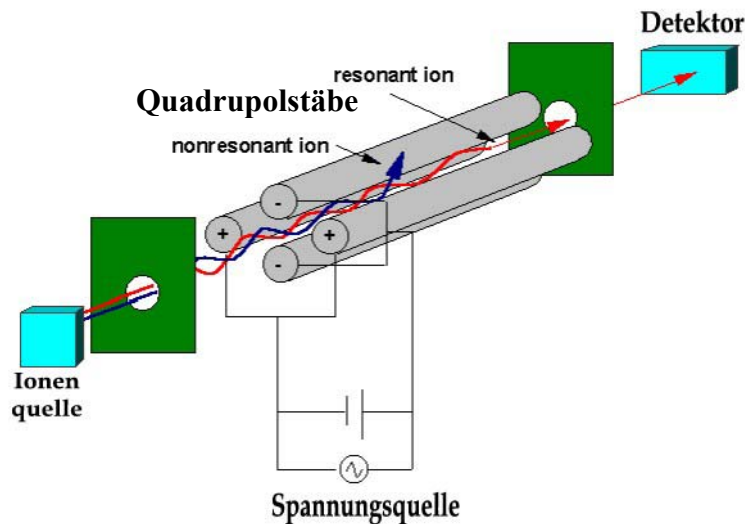
(Agilent Technologies)

### 2.2.6 Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse

Das Massenspektrometer ermöglicht nicht nur einen quantitativen, sondern auch einen qualitativen Nachweis kleinster Substanzmengen. Weitere Vorteile sind die hohe Selektivität und Spezifität. Somit kommt der Massenspektrometrie eine wichtige Rolle in der analytischen Chemie bei der Aufklärung von Struktur und Zusammensetzung von Verbindungen und Gemischen zu.

Das Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten: der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor (Abb. 2.2). Zunächst werden die Moleküle der gaschromatographisch getrennten Substanzen durch Elektronenstoß (EI) ionisiert und in Fragmente zerlegt, deren Molekülmasse und Häufigkeiten typisch für die zu analysierende Substanz sind. Im Quadropol-Analysator wird der Ionenstrom durch vier parallel angeordnete Elektroden geleitet. Zwischen benachbarten Elektroden werden eine Gleich- und eine Wechselspannung angelegt. Die Bahn, welche die Ionen zwischen den Stäben durchlaufen, hängt bei der gegebenen Spannung von ihrer Masse ab. Durch Veränderungen der Spannung trifft die nächsthöhere Masse den Austrittsspalt (Rücker *et al.*, 1992). Die nach Massen getrennten Fragmentationen werden dann dem Multiplier zugeführt, wo sie ein verstärktes elektrisches Signal erzeugen, das zu der Menge der Fragmentationen proportional ist. Dieses wird auf eine EDV-Einheit übertragen. Für jede Masse des eingestellten Massenbereichs kann anschließend ein Chromatogramm abgerufen werden, wobei die Größe der Peaks proportional zur enthaltenen Substanzmenge in der Probe ist (Abb. 2.3). Die Identifizierung des Analysaten erfolgte durch den Vergleich der Massenspektren mit authentischen Referenzsubstanzen.





**Abbildung 2.2:** Der massenselektive Detektor (MSD)

Die Quantifizierung erfolgte durch die Umrechnung des berechneten Peakflächenverhältnisses von Zielsubstanz und internem Standard in die in der Probe enthaltene Substanzmenge. Als interner Standard wurde hier Epikoprostanol verwendet. Die dafür benötigte Geradengleichung wird durch die Messung von Kalibrationslösungen bestimmt, welche die zu analysierenden Komponenten in verschiedenen bekannten Konzentrationen enthalten. Die Linearität der Eichkurven, die Spannweite und die Quantifizierungsgrenze wurden für jede einzelne Substanz überprüft (Tab. 2.6).

Tabelle 2.6. Eichgeradencharakteristika und Nachweisgrenzen

Analyt	Achsenabschnitt	Steigung	R <sup>2</sup>	Spannweite	QG
Lathosterol	-0.0040	0.760	0.9999	0.011-3.20 mg/dl	0.003 µg/dl
Campesterol	-0.0025	0.2451	0.9999	0.020-55.6 mg/dl	0.009 µg/dl
Sitosterol	-0.0056	0.2221	0.9999	0.347-83.9 mg/dl	0.007 µg/dl
Stigmasterol	-0.0020	0.2393	0.9999	0.118-32.2 µg/dl	0.004 µg/dl
Brassicasterol	-0.00001	0.2632	0.9999	0.007-2.10 µg/dl	0.004 µg/dl
Campestanol	-0.0007	0.1394	0.9999	0.025-5.90 µg/dl	0.016 µg/dl
Sitostanol	-0.0153	0.1410	0.9999	0.200-19.3 µg/dl	0.025 µg/dl

R= Korrelationskoeffizient, QG = Untere Quantifizierungsgrenze

Das Massenspektrometer (MS) wurde im Single-Ion-Monitoring (SIM)-Modus betrieben. Hier werden nur die Häufigkeiten vorher festgelegter Fragmente gemessen. Durch die Festlegung auf eine oder mehrere Fragmentmassen verlängert sich die Messzeit jeder einzelnen Masse und erhöht somit die Selektivität der gesamten Analyse (Hübschmann, 1996). Tabelle 2.7 zeigt die Retentionszeiten und Massen aller gemessenen Substanzen. Im Scan-Modus wird ein Spektrum aller entstehenden Fragmente über den gesamten Massenbereich aufgezeichnet. Vergleicht man das gemessene Massenspektrogramm mit Spektren von bekannten Substanzen, so ermöglicht dies eine sichere Identifikation der Substanz.

Tabelle 2.7. Retentionszeiten und Molekülmassen der analysierten Sterole und Stanole

<b>Substanz</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Molekülmasse [m/z]</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>
Epikoprostanol	Interner Standard	370	16.93
Brassicasterol	Phytosterol	470	19.56
Lathosterol	Cholesterol Vorstufe	458	20.28
Campesterol	Phytosterol	472	21.21
Campestanol	Phytostanol	474	21.63
Stigmasterol	Phytosterol	484	21.86
Sitosterol	Phytosterol	486	23.75
Sitostanol	Phytostanol	488	24.27

### **Bedingungen**

Folgende Bedingungen lagen bei der gaschromatographischen-massenspektrometrischen Analyse vor:

Säule:

DB-XLB column (J & W Scientific);

Länge: 30 m

Durchmesser: 0.25 mm

Filmdicke: 0.25  $\mu$ m

## Mobile Phase:

Trärgas: Helium

Fluss: 1 ml/min

## Injektor:

Hewlett-Packard (HP) 7673A

Modus: splittlos

Injektionsvolumen: 2  $\mu$ l

Injektortemperatur: 280 °C

## Ofen:

Hewlett Packard (HP) 5890

Anfangstemperatur: 150 °C

Dauer: 3 min

Endtemperatur: 290 °C

Heizrate: 30 °C/min

Dauer: 23.5 min

## MSD:

Hewlett Packard 5972

Einschaltzeitpunkt: 14 min n.I.

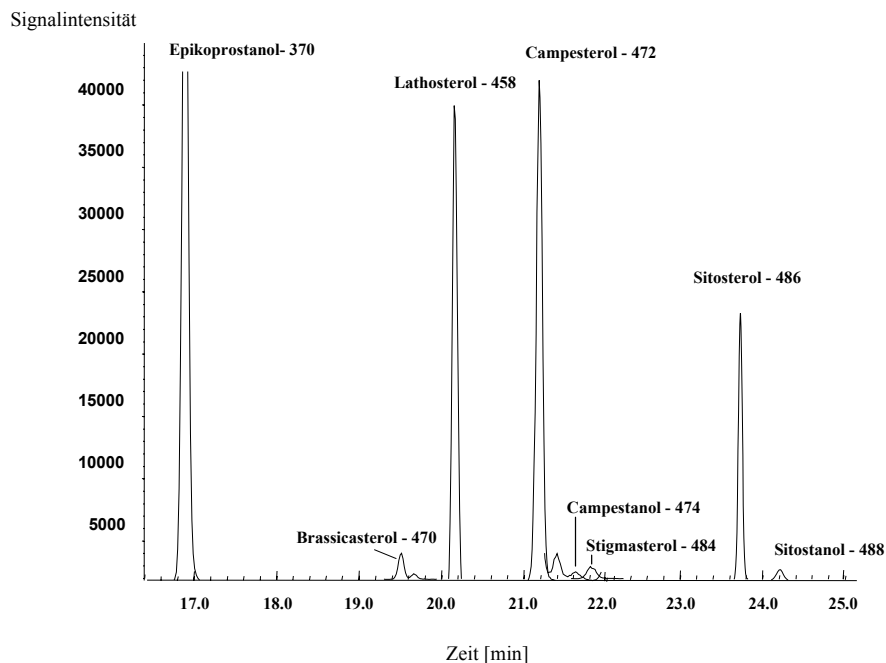
Multiplierspannung: 2400 – 2900 V

Messzeit pro Masse: 50 ms

## Peak-Flächen-Integration:

HP GC ChemStation Software 61701BA, Version B.01.00

(Agilent Technologies)



**Abbildung 2.3:** Chromatogramm eines Kontrollserums zur Analyse von Sterolen und Stanolen mit Epikoprostanol als internem Standard. Die Zahlen neben den Substanznamen geben die Fragmentmassen wieder, welche zur Messung der jeweiligen Substanz eingestellt wurden. Die Abbildung wurde aus Chromatogrammen der einzelnen Massen zusammengestellt.

### 2.2.7 Histologische Untersuchung der Aorta

Die histologischen Untersuchungen wurden am Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soeborg, Dänemark durchgeführt.

Die Ermittlung der Größe der Plaques sowie der Ratio von Intima zu Media, erfolgten mit Hilfe der „Point-Counting-Methode“ (Mortensen *et al.*, 2001). Hierzu wurde ein Stück des oberen Abschnitts der aufsteigenden Aorta in 4 %igem Formaldehyd (pH 7) eingelegt und danach mit Paraffin Wachs fixiert. Das Präparat wurde anschließend in 4 - 6 µm dicke Stücke geschnitten und mit Orcein van Gieson Färbung eingefärbt. Die Schnitte wurden dann mit Hilfe eines Mikroskops mit einem Projektionsspiegel (Olympus Mono Okular) auf einen mit

Gitterpunkten versehenen Untergrund projiziert. Die Zahl der Punkte, welche die Fläche der Media, und die Zahl der Punkte, die die Fläche der Intima überdeckten, wurden gezählt. Da das Flächenäquivalent eines Punktes des Rasters bekannt war, konnte dann die Fläche der Plaques berechnet werden. Die Ratio von Intima zu Media konnte durch Division der Anzahl der Punkte über der Intima durch die Anzahl der Punkte über der Media berechnet werden.

### **2.2.8 Statistische Berechnung**

Die Originaldaten wurden in Excel-Dateien eingegeben. Statistische Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) durchgeführt.

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. Statistische Unterschiede zwischen dem Basis- und dem Endwert der Plasmakonzentrationen innerhalb einer Gruppe, wurden mit dem t-Test für gepaarte Stichproben geprüft. Zur Ermittlung von Unterschieden der Parameter zwischen den einzelnen Gruppen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Ein Wert von  $p \leq 0.05$  wurde als signifikanter Wert angenommen. Korrelationen zwischen einzelnen Parametern wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Futter

##### Futter der Vorstudien

Tabelle 3.1 zeigt den Gehalt an Sterolen und Stanolen im Futter der beiden Vorstudien.

In der 19-Tages Studie erhielten die Tiere unterschiedliche Dosierungen von aus Rapsöl hergestellten Stanolestern oder ein Futter mit Sterolestern, die ebenfalls aus Rapsöl stammten. Dem Kontrollfutter wurde zusätzlich Rapsöl zugesetzt, um den Fettgehalt der anderen Futter zu erreichen, welcher zur Herstellung der Ester benötigt wurde.

In der 28-Tages Studie gab es eine Gruppe die mit Standard Futter gefüttert wurde sowie zwei Gruppen die Futter mit unterschiedlichen Mengen an Cholesterol erhielten.

Tabelle 3.1. Sterol- und Stanolgehalt des Futters der Vorstudien

Futter	Chole- sterol	Campe- sterol	Sito- sterol	Stigma- sterol	Brassica- sterol	Campe- stanol	Sito- stanol
<b>19 Tage</b>				ng/mg			
0.40 % Rapsöl + 0.1 % CH	1026	112	322	34.3	9.64	45	114
1.00 % Sterolester* + 0.1 % CH	946	3470	4559	58.6	1051	112	376
0.25 % Stanolester* + 0.1 % CH	927	172	371	30.6	20.3	1279	1450
0.50 % Stanolester* + 0.1 % CH	1028	150	320	33.5	9.33	3176	3343
1.00 % Stanolester* + 0.1 % CH	938	203	344	33.5	12.5	5183	5677
<b>28 Tage</b>							
Standard Futter	10.1	98.7	325	32.0	2.76	64	109
0.1 % CH	995	96.6	285	32.3	2.81	65	102
0.2 % CH	1878	93.6	277	31.9	2.92	81	119

CH = Cholesterol, \* aus Rapsöl stammend

##### Futter der Hauptstudien

In Tabelle 3.2 ist die Zusammensetzung des Futters der beiden Hauptstudien aufgeführt. Die tägliche Aufnahme der Kaninchen lag bei 100 g. Im Vergleich zu den für Menschen empfohlenen 2-3 g an pflanzlichen Sterolen pro Tag (0.04 g/kg Körpergewicht) bekamen die Tiere eine 25 mal höhere Dosis.

Bei den mit 3.4 % Stanolestern angereicherten Futtern, war im Vergleich zu den Kontrollfuttern, neben dem vorgesehenen hohen Gehalt an Stanolen (Campestanol ca.

200 mal höher, Sitostanol ca. 70 mal höher) auch der Gehalt an pflanzlichen Sterolen erhöht (Campesterol 2.5-fach höher, Sitosterol 1.5-fach höher, Brassicasterol 7-fach höher).

Bei den mit 3.4 % Sterolestern versetzten Futtern, war neben dem Gehalt der pflanzlichen Sterole (Campesterol 88 mal höher, Sitosterol 30 - 39 mal höher, Stigmasterol 2.5 - 3.8 mal höher, Brassicasterol 594 – 844 mal höher) auch der Gehalt an Campestanol (3.5 - 4.5 mal höher) erhöht. Der Gehalt an Sitostanol blieb hier nahezu unverändert.

Tabelle 3.2. Sterol- und Stanolgehalt des Futters der Hauptstudien

<b>Futter</b>	<b>Chole- sterol</b>	<b>Campe- sterol</b>	<b>Sito- sterol</b>	<b>Stigma- sterol</b>	<b>Brassica- sterol</b>	<b>Campe- stanol</b>	<b>Sito- stanol</b>
<b>Heterozygote Tiere</b>				ng/mg			
0.2 % CH	1968	86.1	332	18.7	3.31	48	171
0.2 % CH + 1.7 % Stanolester*	2106	110	365	20.7	10.3	4494	5681
0.2 % CH + 3.4 % Stanolester*	2037	209	405	20.7	22.1	9337	11373
0.2 % CH + 3.4 % Sterolester*	1907	7526	9691	72.0	1967	168	157
<b>Homozygote Tiere</b>							
Standard Futter	8.92	90.0	268	30.8	2.61	42	154
1.7 % Stanolester*	11.3	109	364	21.9	9.17	4556	5366
3.4 % Stanolester*	20.3	238	406	22.4	18.5	9377	11672
3.4 % Sterolester*	13.7	7949	10225	78.0	2204	188	173

CH = Cholesterol, \* aus Rapsöl stammend

Sieht man sich die prozentualen Anteile der pflanzlichen Sterole und Stanole an, so zeigt sich, dass in dem Kontrollfutter der homozygoten Kaninchen sowie in dem mit 0.2 % Cholesterol angereicherten Kontrollfutter der heterozygoten Tiere der prozentuale Anteil des Campesterols an den gesamten pflanzlichen Sterolen bei ungefähr 20 %, der des Sitosterols bei 69 – 76 % lag. Stigmasterol (4.2 – 7.9 %) und Brassicasterol (0.7 – 0.8 %) spielten hier nur eine geringe Rolle. Eine Anreicherung des Futters mit 3.4 % Stanol- oder Sterolestern, erhöhte den Anteil des Campesterols auf 32 – 39 % und der Anteil des Sitosterols sank auf 50 – 61 % der Gesamtsterole. Stigmasterol war in dem mit 3.4 % Stanolestern versetzten Futtern zu 3.2 % enthalten und in den Futtern mit Sterolestern nur noch zu 0.4 %. Der Anteil des Brassicasterols erhöhte sich in den Futtern mit 3.4 % Stanolester auf 2.7 – 3.4 % und in den Futtern, welche mit Sterolestern versetzt wurden, lag der Anteil bei ungefähr 10 %. Bei den pflanzlichen Stanolen zeigten Campestanol und Sitostanol in den Kontrollfuttern eine Verteilung von 22 % zu 78 %. Bei Anreicherung mit Stanolen verschob sich das Verhältnis

auf 45 % zu 55 % und bei der Anreicherung mit Sterolestern ergab sich ein Verhältnis von 52 % zu 48 %.

## **3.2 Ergebnisse der Pilotstudien**

### **3.2.1 Ergebnisse der 19-Tages Studie**

Die 19-Tages Studie diente der Ermittlung der Phytosterol- und Phytostanoldosis, die in den beiden Hauptstudien an die WHHL-Kaninchen gefüttert werden sollte.

#### **Plasmakonzentrationen**

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen konnte in allen Gruppen ein zumindest tendenzieller Anstieg des Plasma-Cholesterols zwischen Tag 1 und Tag 19 beobachtet werden (Tab. 3.3). In der Gruppe, welche zusätzlich 0.1 % Cholesterol und 1.0 % Sterolester gefüttert bekam, war der Anstieg des Cholesterols im Vergleich zu der Gruppe, die lediglich 0.1 % Cholesterol erhielt, am geringsten ( $37.7 \pm 17.23$  mg/dl vs.  $147 \pm 54.5$  mg/dl,  $p = 0.030$ ). An zweiter Stelle stand hier die Gruppe mit 0.1 % Cholesterol und 0.5 % Stanolestern ( $45.7 \pm 27.3$  mg/dl vs.  $147 \pm 54.5$  mg/dl,  $p = 0.045$ ). Bei der Fütterung mit Cholesterol und Sterolestern, stieg die Campesterolkonzentration im Plasma nach 19 Tagen um mehr als das 8-fache an ( $p = 0.004$ ). Nach der Zufuhr von Cholesterol und Stanolestern konnte - unabhängig von der Dosierung - ein ungefähr 10-facher Anstieg des Campestanol und eine 3 - 4-fache Erhöhung der Sitostanolkonzentration beobachtet werden. Die Plasmakonzentration des Campestanols bei Stanolfütterung lag jedoch trotzdem um das 15 - 25-fache niedriger als die Konzentration von Campesterol bei der Zufuhr von pflanzlichen Sterolen. Die Cholesterolsynthese, welche durch den Synthesemarker Lathosterol/Cholesterol angezeigt wurde, ging lediglich in der Gruppe, welche zusätzlich nur Cholesterol zugeführt bekam, um 50 % zurück ( $p = 0.003$ ).



Tabelle 3.3. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

Sterol/Stanol	0.1 % Cholesterol		0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester		0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester		0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester		0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester	
	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19
Cholesterol (mg/dl)	105 ± 4.73	252 ± 51.1 <sup>a</sup>	99.3 ± 35.0	137 ± 17.8 <sup>a,d</sup>	119 ± 11.5	299 ± 64.0 <sup>a</sup>	157 ± 61.6	202 ± 68.8	91.7 ± 52.5	165 ± 23.9
Lathosterol (mg/dl)	0.18 ± 0.004	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.08	0.16 ± 0.04	0.19 ± 0.09	0.25 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.02 <sup>e</sup>
Campesterol (mg/dl)	1.69 ± 0.13	3.84 ± 0.78	1.39 ± 0.27	10.9 ± 2.23 <sup>a,e</sup>	1.55 ± 0.11	4.03 ± 0.93	2.70 ± 1.13	2.27 ± 1.06	1.58 ± 0.58	1.30 ± 0.04 <sup>e</sup>
Sitosterol (mg/dl)	0.68 ± 0.09	0.93 ± 0.05	0.60 ± 0.20	1.03 ± 0.18	0.63 ± 0.11	0.60 ± 0.11 <sup>e</sup>	1.05 ± 0.61	0.57 ± 0.34	0.62 ± 0.21	0.28 ± 0.04 <sup>f</sup>
Campestanol (µg/dl)	47.5 ± 7.65	120 ± 20.8 <sup>a</sup>	46.6 ± 19.8	137 ± 58.8	46.7 ± 8.74	618 ± 104 <sup>b,f</sup>	74.6 ± 39.2	689 ± 316 <sup>d</sup>	40.9 ± 16.7	421 ± 80.8 <sup>a,d</sup>
Sitostanol (µg/dl)	27.3 ± 5.30	39.5 ± 2.95	26.0 ± 13.3	25.1 ± 9.02	32.6 ± 8.05	130 ± 21.4 <sup>b,e</sup>	45.3 ± 20.9	139 ± 64.0	23.5 ± 10.8	78.4 ± 14.0 <sup>a,d</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	1.75 ± 0.09	0.88 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.37	1.18 ± 0.13	1.62 ± 0.76	0.83 ± 0.07	1.11 ± 0.50	0.78 ± 0.10	1.78 ± 1.00	0.76 ± 0.09
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	16.1 ± 1.52	15.3 ± 2.20	14.8 ± 3.72	80.8 ± 20.5 <sup>a,e</sup>	13.1 ± 2.14	13.6 ± 2.20	17.6 ± 6.07	11.1 ± 3.10	18.6 ± 3.85	7.98 ± 1.26 <sup>a,d</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	6.51 ± 0.87	3.77 ± 0.71 <sup>a</sup>	6.09 ± 0.59	7.67 ± 2.26 <sup>d</sup>	5.30 ± 1.19	2.03 ± 0.30 <sup>d</sup>	7.01 ± 3.91	2.74 ± 1.16	7.40 ± 1.77	1.68 ± 0.13 <sup>a,d</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.45 ± 0.05	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.11	1.00 ± 0.39	0.39 ± 0.05	2.10 ± 0.35 <sup>b,f</sup>	0.50 ± 0.26	3.39 ± 0.93 <sup>b,d</sup>	0.49 ± 0.18	2.54 ± 0.16 <sup>b,f</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.26 ± 0.04	0.16 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.06	0.18 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.05	0.44 ± 0.09 <sup>a,e</sup>	0.31 ± 0.14	0.68 ± 0.20 <sup>b,e</sup>	0.28 ± 0.11	0.47 ± 0.02 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 19; <sup>d</sup> p ≤ 0.05, <sup>e</sup> p ≤ 0.01, <sup>f</sup> p ≤ 0.001 vs. Tag 19 der Kontrollgruppe (0.1 % Cholesterol)

Bei den homozygoten WHHL-Kaninchen zeigte sich ebenfalls ein nicht immer signifikanter aber tendenzieller Anstieg des Plasma-Cholesterols nach 19 Tagen (Tab. 3.4). Auch hier war im Vergleich zur Kontrollgruppe (0.1 % Cholesterol) die Zunahme in der Sterolestergruppe am geringsten ( $118 \pm 138$  mg/dl vs.  $486 \pm 165$  mg/dl,  $p = 0.042$ ). Bei einer Fütterung mit 0.1 % Cholesterol und 1.0 % Stanolestern über 19 Tage stieg die Cholesterolkonzentration um  $138 \pm 44.3$  mg/dl an ( $p = 0.024$ ).

Die Konzentration von Campesterol ( $p = 0.004$ ) und Sitosterol ( $p = 0.014$ ) erhöhte sich nach 19-tägiger Sterolfütterung um das 9- bzw. 2-fache. Im Gegensatz dazu konnte durch die Zufuhr von 0.1 % Cholesterol und 1.0 % Stanolestern die Konzentration an Campesterol um 35 % ( $p = 0.005$ ) und die des Sitosterols um 60 % ( $p = 0.010$ ) gesenkt werden. Ähnlich wie bei den heterozygoten Tieren stieg bei den Gruppen, welche zusätzlich Cholesterol und Stanolester bekamen, die Konzentration von Campestanol um das 13 – 18-fache, die des Sitostanols um das 4-fache an. Die Konzentration des Campestanols war auch in den Stanolgruppen um das 30 – 45-fache niedriger als die Konzentration an Campesterol bei den mit Sterolestern gefütterten Kaninchen.

Die Cholesterolsynthese, dargestellt durch die Ratio von Lathosterol zu Cholesterol, ging in der Gruppe mit 0.1 % Cholesterol und 1.0 % Sterolestern (-28 %,  $p = 0.025$ ), bei der Zufuhr von 0.1 % Cholesterol und 0.5 % Stanolestern (-28 %,  $p = 0.021$ ) sowie bei der Fütterung mit 0.1 % Cholesterol und 1 % Stanolestern (-46 %,  $p = 0.021$ ) nach 19 Tagen zurück.

Tabelle 3.4. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei homozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

Sterol/Stanol	0.1 % Cholesterol		0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester		0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester		0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester		0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester	
	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19	Tag 1	Tag 19
Cholesterol (mg/dl)	822 ± 158	1307 ± 32.2 <sup>a</sup>	989 ± 175	1107 ± 167	1043 ± 106	1183 ± 114	914 ± 223	1281 ± 91.4	843 ± 66.6	981 ± 93.0 <sup>a,e</sup>
Lathosterol (mg/dl)	1.03 ± 0.44	1.37 ± 0.10	1.27 ± 0.19	1.03 ± 0.17 <sup>d</sup>	0.95 ± 0.67	1.04 ± 0.26	0.94 ± 0.26	0.93 ± 0.08 <sup>e</sup>	1.13 ± 0.09	0.72 ± 0.23 <sup>a,d</sup>
Campesterol (mg/dl)	12.0 ± 3.74	18.7 ± 2.32	12.3 ± 1.53	111 ± 12.8 <sup>b,e</sup>	14.3 ± 3.07	19.1 ± 4.17 <sup>a</sup>	13.3 ± 3.16	12.6 ± 2.33 <sup>d</sup>	12.2 ± 2.16	7.92 ± 1.77 <sup>b,e</sup>
Sitosterol (mg/dl)	4.98 ± 0.99	4.05 ± 0.15	4.46 ± 1.05	8.22 ± 0.56 <sup>a,f</sup>	4.90 ± 1.60	3.11 ± 0.77	5.18 ± 1.39	2.90 ± 0.72 <sup>a</sup>	4.40 ± 0.70	1.80 ± 0.25 <sup>b,f</sup>
Campestanol (µg/dl)	253 ± 82.2	417 ± 74.5	293 ± 18.6	397 ± 68.0	190 ± 121	2498 ± 820 <sup>a,d</sup>	198 ± 39.3	3473 ± 794 <sup>a,d</sup>	175 ± 10.5	2765 ± 365 <sup>b,f</sup>
Sitostanol (µg/dl)	145 ± 53.7	132 ± 29.7	147 ± 13.2	89.7 ± 5.59 <sup>a</sup>	98.8 ± 53.7	407 ± 127 <sup>d</sup>	116 ± 30.9	517 ± 68.8 <sup>b,f</sup>	93.0 ± 12.7	391 ± 57.0 <sup>b,e</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	1.21 ± 0.34	1.05 ± 0.08	1.29 ± 0.18	0.93 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.65	0.88 ± 0.23	1.02 ± 0.08	0.73 ± 0.02 <sup>a,e</sup>	1.34 ± 0.08	0.72 ± 0.16 <sup>a,d</sup>
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	14.3 ± 2.04	14.3 ± 1.46	12.6 ± 2.41	102 ± 24.5 <sup>a,d</sup>	13.7 ± 2.34	16.0 ± 2.23	14.7 ± 1.69	9.84 ± 1.57 <sup>d</sup>	14.4 ± 1.48	8.01 ± 1.01 <sup>b,e</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	6.06 ± 0.26	3.10 ± 0.70 <sup>b</sup>	4.63 ± 1.51	7.59 ± 1.73 <sup>b,d</sup>	4.67 ± 1.23	2.60 ± 0.41 <sup>a</sup>	5.66 ± 0.39	2.26 ± 0.54 <sup>b</sup>	5.25 ± 0.97	1.84 ± 0.28 <sup>a,e</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.30 ± 0.05	0.32 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.36 ± 0.06	0.19 ± 0.14	2.08 ± 0.50 <sup>a,e</sup>	0.22 ± 0.01	2.70 ± 0.51 <sup>a,d</sup>	0.21 ± 0.02	2.81 ± 0.14 <sup>c,f</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.17 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.08 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.06	0.34 ± 0.08 <sup>e</sup>	0.13 ± 0.01	0.40 ± 0.04 <sup>b,f</sup>	0.11 ± 0.02	0.40 ± 0.07 <sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 19; <sup>d</sup> p ≤ 0.05, <sup>e</sup> p ≤ 0.01, <sup>f</sup> p ≤ 0.001 vs. Tag 19 der Kontrollgruppe (0.1 % Cholesterol)

Vergleicht man die beiden Genotypen miteinander, so zeigt sich, dass homozygote Watanabe Kaninchen bis zu 10-fach höhere Konzentrationen von Cholesterol ( $p = 0.000$ ) und pflanzlichen Sterolen (Campesterol  $p = 0.014$ , Sitosterol  $p = 0.000$ ) im Plasma aufwiesen als die heterozygoten Tiere. Die Phytostanolkonzentrationen lagen dagegen nur um das 4 – 6-fache höher ( $p = 0.000$ ).

Da die durch die Zugabe der Phytosterole und Phytostanole erreichten Effekte auf die Cholesterolkonzentration, die Cholesterolsynthese sowie auf die Plaquebildung mit den in dieser Studie verwendeten Dosierungen nicht deutlich genug hervortraten, wurde entschieden, in den Hauptstudien deutlich höhere Phytosterol- und Phytostanoldmengen einzusetzen (siehe Tab. 3.2).

Bei dieser Studie wurden neben den Konzentrationen von Cholesterol, Cholesterol-Vorstufen, sowie von Phytosterolen und –stanolen im Plasma, auch die Konzentration dieser Substanzen in der Leber, der Galle, der Intima der Aorta sowie im Gehirn gemessen. Da diese Parameter für die Bestimmungen der Dosierungen der Hauptstudien jedoch nicht entscheidend waren, sind diese Ergebnisse im Anhang dargestellt.

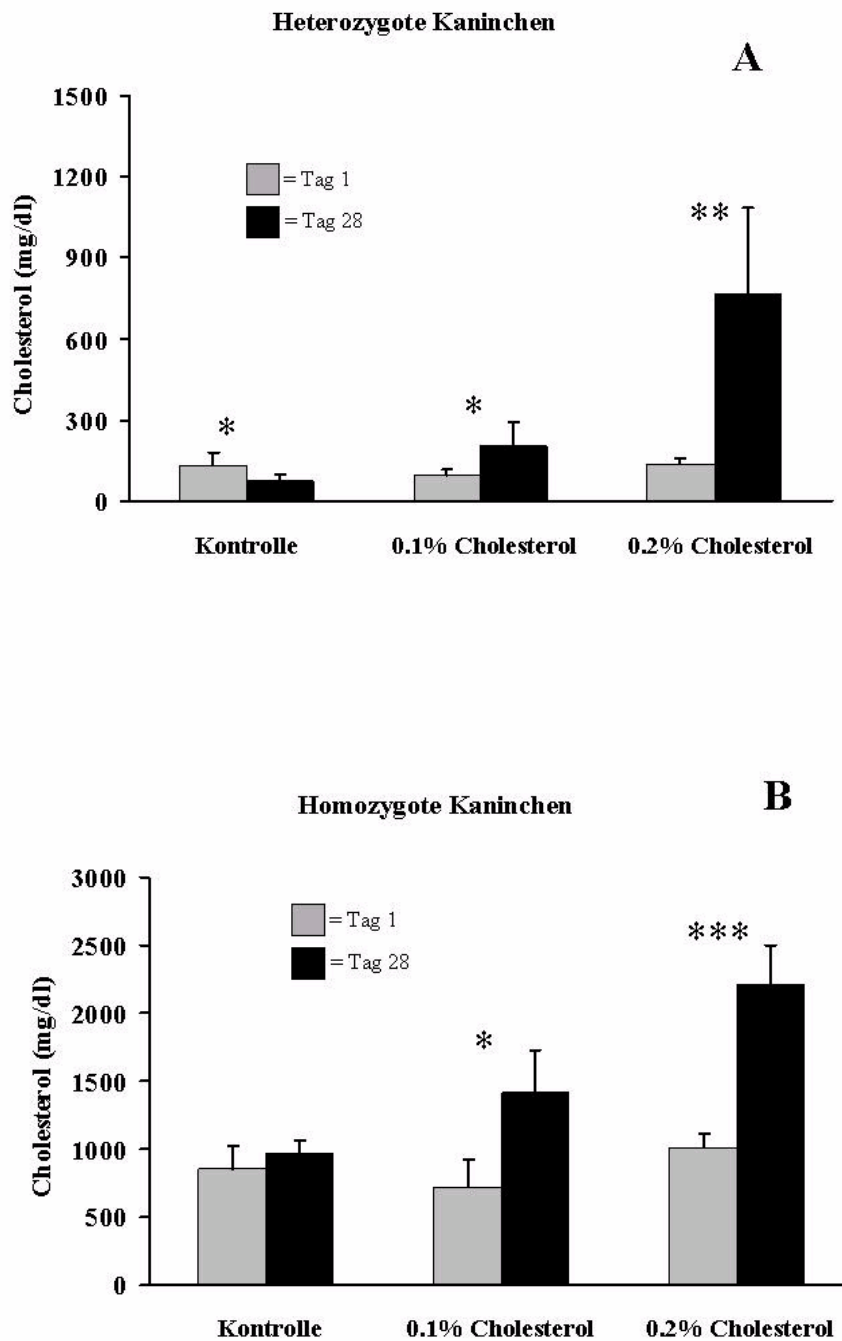
### **3.2.2 Ergebnisse der 28-Tages Studie**

Mit Hilfe dieser Studie sollte die Dosierung des Cholesterols in den Hauptstudien festgesetzt werden.

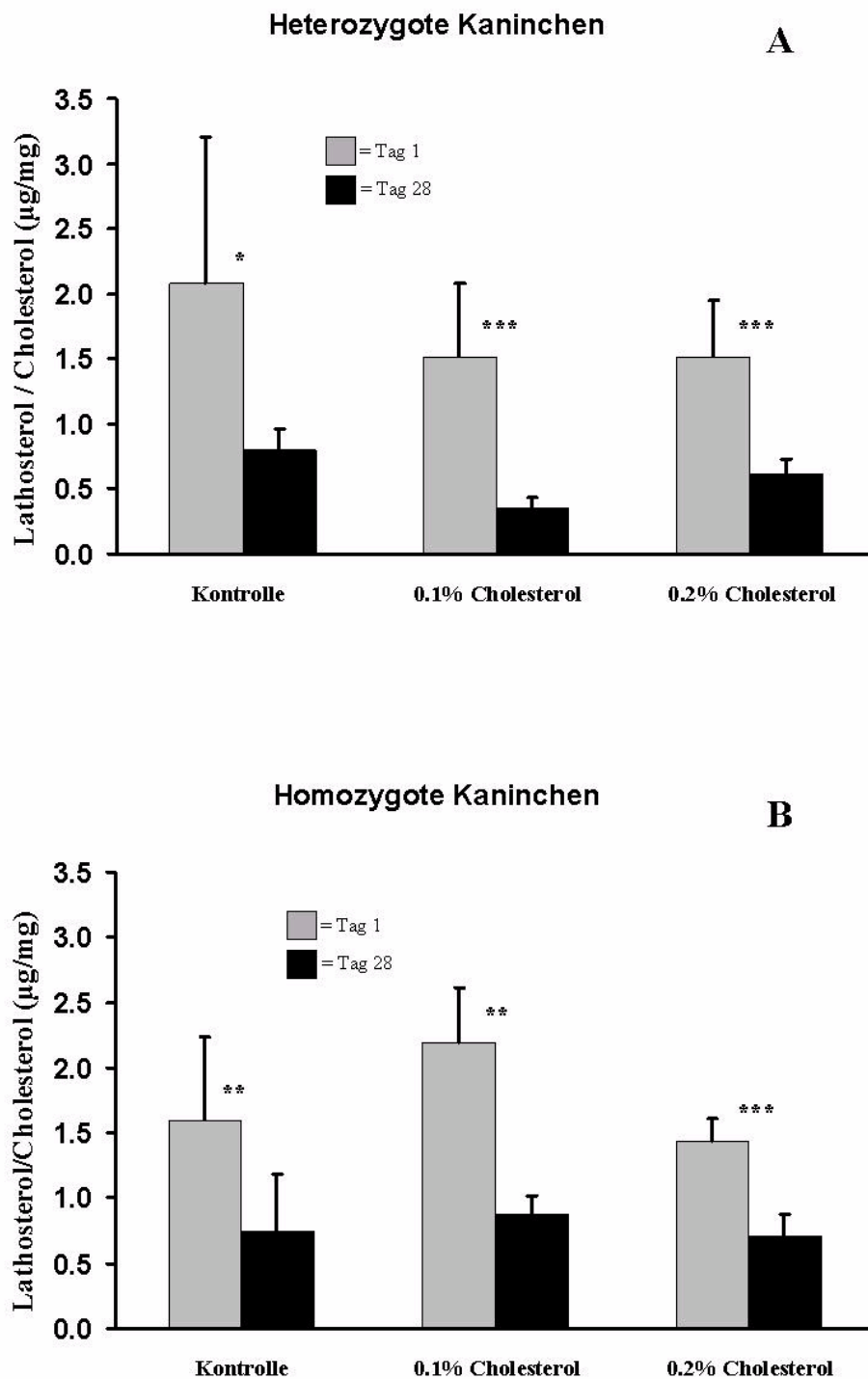
#### **Plasmakonzentrationen**

Bei den heterozygoten Kaninchen, die über 28 Tage 0.1 % Cholesterol erhielten, erhöhte sich die Cholesterolkonzentration im Plasma um das Doppelte ( $p = 0.016$ ) (Abb. 3.1). Deutlicher war dieser Anstieg bei den Kaninchen, welche 0.2 % Cholesterol zu sich nahmen (6-fach,  $p = 0.002$ ). In der Kontrollgruppe nahm die Konzentration des Cholesterols um 43 % ab ( $p = 0.011$ ). Die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) sank in allen drei Gruppen, unabhängig davon, ob die Tiere Cholesterol bekamen oder nicht (Abb. 3.2). Unter der Zufuhr von Cholesterol war die Synthese jedoch noch niedriger als bei den Tieren, die kein Cholesterol bekamen (0.1 % Cholesterol  $p = 0.000$ , 0.2 % Cholesterol  $p = 0.031$ ).

Anhand dieser Daten wurde entschieden, den heterozygoten Watanabe Kaninchen in den Hauptstudien ebenfalls 0.2 % Cholesterol zu füttern.



**Abbildung 3.1:** Plasma Cholesterolkonzentration (MW  $\pm$  SD) von heterozygoten (n = 7) (A) und homozygoten (n = 5) (B) Watanabe Kaninchen an Tag 1 und Tag 28 (\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  Tag 1 vs. Tag 28) in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt des Futters



**Abbildung 3.2:** Ratio von Lathosterol zu Cholesterol (MW  $\pm$  SD) bei heterozygoten ( $n = 7$ ) (A) und homozygoten ( $n = 5$ ) (B) Watanabe Kaninchen an Tag 1 und Tag 28 (\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$  Tag 1 vs. Tag 28) in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt des Futters

Bei den homozygoten Kaninchen zeigte sich ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg der Plasma-Cholesterolkonzentration (0.1 % Cholesterol: 1.9-fach,  $p = 0.019$ ; 0.2 % Cholesterol: 2.2-fach,  $p = 0.000$ ) von Tag 1 bis Tag 28 (Abb. 3.1). Bei der Kontrollgruppe hingegen änderte sich das Plasma-Cholesterol nicht.

Wie auch bei den heterozygoten Tieren, so wurde auch in allen Gruppen der homozygoten Kaninchen ein Rückgang der Cholesterolsynthese zwischen Tag 1 und Tag 28 gefunden (Abb. 3.2). Einen Unterschied in der Cholesterolsynthese zwischen den Gruppen gab es bei diesen Kaninchen jedoch nicht.

Die homozygoten Watanabe Kaninchen haben schon aufgrund ihres LDL-Rezeptor Defektes sehr hohe Plasma-Cholesterolkonzentrationen. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt, können diese durch eine cholesterolreiche Ernährung, Werte von über 2000 mg/dl erreichen. Da die Tiere zwar 28 aber voraussichtlich nicht 120 Tage mit diesen hohen Cholesterolkonzentrationen im Plasma überleben, ist entschieden worden, den homozygoten Kaninchen in den Hauptstudien kein Cholesterol zu füttern. Zudem versuchte man auf diese Weise vergleichbare Plasmakonzentrationen bei heterozygoten und homozygoten Kaninchen zu erreichen.

Auch in der 28-Tages Studie wurden zusätzlich die Konzentration von Phytosterolen und -stanolen im Plasma, in der Leber, der Galle, der Intima der Aorta sowie im Gehirn gemessen. Sie waren aber auch hier nicht entscheidend für die gewählte Cholesteroldosis in den Hauptstudien und werden deswegen im Anhang dargestellt.

### **3.3 Ergebnisse der Hauptstudien**

#### **3.3.1 Homozygote Watanabe Kaninchen**

##### **Plasmakonzentrationen**

Im Plasma der homozygoten Kaninchen ließ sich bei keiner Gruppe ein Unterschied der Cholesterolkonzentration zwischen Tag 1 und Tag 120 feststellen (Tab. 3.5). Die Cholesterolsynthese, dargestellt durch die Ratio von Lathosterol zu Cholesterol, ging bei allen Tieren im Laufe der Zeit zurück.

Durch die Fütterung mit 1.7 % Stanolestern kam es nach 120 Tagen zu einer signifikanten Reduzierung der Plasmakonzentration der pflanzlichen Sterole. Deutlicher ist diese Abnahme jedoch bei der Zufuhr von 3.4 % Stanolestern. Die Campesterol- ( $p = 0.000$ ) und die Sitosterolkonzentration ( $p = 0.000$ ) wurden hier um ungefähr das zweifache gesenkt. Im Vergleich zu den mit Standard Futter gefütterten Kontrolltieren, war die Campesterolkonzentration im Plasma der 3.4 % Stanolestergruppe an Tag 120 um 63 % ( $p = 0.000$ ), das Sitosterol um 70 % ( $p = 0.000$ ) niedriger.

Bemerkenswert war der Anstieg der Plasmakonzentration der pflanzlichen Stanole bei der Fütterung mit Stanolestern. Schon bei einer Zufuhr von 1.7 % der Stanolester stieg die Campestanolkonzentration nach 120 Tagen um das 20-fache ( $p = 0.000$ ), die Sitostanolkonzentration erhöhte sich um das 7-fache ( $p = 0.000$ ). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Campestanolkonzentration um das 10-fache ( $p = 0.000$ ), die des Sitostanols um das 4-fache ( $p = 0.000$ ) höher. Betrachtet man die Tiere, welche 3.4 % Stanolester bekamen, so zeigte sich ein noch stärkerer Anstieg des Campestanols am Ende der Studie. Verdeutlicht wurde die enorme Zunahme der Phytostanole durch die um das 10-fache höhere Ratio von Campestanol zu Cholesterol im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0.000$ ).

Bei den Kaninchen, welche 3.4 % Sterolester hinzugefüttert bekamen, war die Konzentration des Campesterols nach 120 Tagen 11-fach ( $p = 0.000$ ), die des Sitosterols 3-fach ( $p = 0.000$ ) höher als zu Beginn der Studie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lag das Campesterol um das 7-fache ( $p = 0.000$ ), das Sitosterol um das 1.3-fache ( $p = 0.003$ ) höher. Andere Sterole wie Stigmasterol ( $12.5 \pm 2.42 \mu\text{g/dl}$ ) und Brassicasterol ( $834 \pm 288 \mu\text{g/dl}$ ) lagen im Verhältnis zu Campesterol und Sitosterol in nur sehr geringen Konzentrationen vor.

Auch die Konzentration der pflanzlichen Stanole nahm bei der Fütterung mit Sterolestern zu (Campestanol 3.7-fach,  $p = 0.000$ ; Sitostanol 1.2-fach,  $p = 0.018$ ). Campestanol war um das 1.6-fache höher als in der Gruppe, die Standard Futter bekam ( $p = 0.000$ ), während Sitostanol in diesem Vergleich um das 1.6-fache niedriger war ( $p = 0.000$ ).

Bemerkenswert bei der Beobachtung der verschiedenen Fütterungen war, dass die Konzentration des Campestanols bei der Stanolesterzufuhr trotz des enormen Anstieges noch um das 18-fache niedriger war als der Gehalt des Campesterols bei der Gabe von Sterolestern. Die Konzentration des Sitostanols war um das 8-fache niedriger als die des Sitosterols.



Tabelle 3.5. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol bei homozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17)

Sterol/Stanol	Standard Futter		1.7 % Stanolester		3.4 % Stanolester		3.4 % Sterolester	
	Tag1	Tag 120	Tag1	Tag 120	Tag1	Tag 120	Tag1	Tag 120
Cholesterol (mg/dl)	1031 ± 173	1065 ± 173	1056 ± 183	1115 ± 174	1001 ± 222	1046 ± 212	1003 ± 159	911 ± 156 <sup>e</sup>
Lathosterol (mg/dl)	1.06 ± 0.29	0.63 ± 0.24 <sup>c</sup>	1.10 ± 0.31	0.70 ± 0.22 <sup>c</sup>	1.14 ± 0.45	0.68 ± 0.19 <sup>c</sup>	1.09 ± 0.25	0.76 ± 0.18 <sup>c</sup>
Campesterol (mg/dl)	12.0 ± 2.31	17.4 ± 2.62 <sup>c</sup>	13.0 ± 2.33	9.07 ± 2.39 <sup>c,f</sup>	11.5 ± 2.15	6.52 ± 1.26 <sup>c,f</sup>	10.5 ± 1.91	118 ± 31.6 <sup>c,f</sup>
Sitosterol (mg/dl)	5.31 ± 1.16	8.52 ± 2.16 <sup>c</sup>	5.21 ± 0.84	3.50 ± 0.89 <sup>c,f</sup>	5.06 ± 1.23	2.54 ± 0.56 <sup>c,f</sup>	4.07 ± 1.52	10.9 ± 2.31 <sup>c,e</sup>
Campestanol (µg/dl)	367 ± 62.6	696 ± 164 <sup>c</sup>	346 ± 84.9	6587 ± 2219 <sup>c,f</sup>	329 ± 97.7	6669 ± 2493 <sup>c,f</sup>	302 ± 49.7	1144 ± 234 <sup>c,f</sup>
Sitostanol (µg/dl)	196 ± 70.9	286 ± 82.8 <sup>c</sup>	155 ± 32.5	1268 ± 273 <sup>c,f</sup>	167 ± 103	1249 ± 271 <sup>c,f</sup>	145 ± 26.5	175 ± 44.5 <sup>a,f</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	1.04 ± 0.29	0.59 ± 0.21 <sup>c</sup>	1.07 ± 0.36	0.63 ± 0.19 <sup>c</sup>	1.16 ± 0.46	0.68 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.10 ± 0.26	0.85 ± 0.20 <sup>b,f</sup>
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	11.8 ± 2.00	16.5 ± 2.73 <sup>c</sup>	12.5 ± 2.14	8.21 ± 1.96 <sup>c,f</sup>	12.0 ± 3.31	6.43 ± 1.63 <sup>c,f</sup>	10.7 ± 2.55	131 ± 33.6 <sup>c,f</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	5.24 ± 1.17	8.09 ± 1.97 <sup>c</sup>	5.09 ± 1.29	3.19 ± 0.82 <sup>c,f</sup>	5.26 ± 1.63	2.55 ± 0.83 <sup>c,f</sup>	4.15 ± 1.71	12.1 ± 2.74 <sup>c,f</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.36 ± 0.08	0.68 ± 0.21 <sup>c</sup>	0.33 ± 0.08	6.01 ± 2.04 <sup>c,f</sup>	0.33 ± 0.07	6.61 ± 2.71 <sup>c,f</sup>	0.31 ± 0.06	1.28 ± 0.34 <sup>c,f</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.19 ± 0.07	0.27 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.15 ± 0.03	1.14 ± 0.19 <sup>c,f</sup>	0.16 ± 0.09	1.22 ± 0.27 <sup>c,f</sup>	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.06 <sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 120; <sup>d</sup> p ≤ 0.05, <sup>e</sup> p ≤ 0.01, <sup>f</sup> p ≤ 0.001 vs. Tag 120 der Kontrollgruppe (Standard Futter)

**Leber**

In Tabelle 3.6 sieht man, dass bei den homozygoten Watanabe Kaninchen lediglich bei den mit 3.4 % Sterolestern gefütterten Tieren eine Senkung der Cholesterolkonzentration in der Leber im Vergleich zur Standard-Diätgruppe nachweisbar war (-15 %,  $p = 0.008$ ). Einen Unterschied in der Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) gab es zwischen den einzelnen Gruppen nicht.

Tabelle 3.6. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Leber von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 18$ ,  $MW \pm SD$ , Sterolester  $n = 17$ )

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>Standard Futter</b>	<b>1.7 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$7.87 \pm 1.04$	$8.31 \pm 1.45$	$8.54 \pm 1.01$	$6.67 \pm 1.45^b$
Lathosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.018 \pm 0.012$	$0.020 \pm 0.014$	$0.021 \pm 0.011$	$0.018 \pm 0.010$
Campesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.15 \pm 0.03$	$0.07 \pm 0.02^c$	$0.06 \pm 0.02^c$	$1.06 \pm 0.29^c$
Sitosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.07 \pm 0.03$	$0.03 \pm 0.01^c$	$0.02 \pm 0.01^c$	$0.09 \pm 0.03^a$
Campestanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$4.55 \pm 1.75$	$48.8 \pm 20.6^c$	$58.3 \pm 23.6^c$	$11.1 \pm 4.66^c$
Sitostanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$2.00 \pm 0.94$	$6.82 \pm 2.28^c$	$7.71 \pm 2.30^c$	$1.34 \pm 0.35^a$
Lathosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$2.28 \pm 1.48$	$2.53 \pm 2.01$	$2.57 \pm 1.49$	$2.91 \pm 1.97$
Campesterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$19.7 \pm 4.40$	$8.54 \pm 2.15^c$	$7.21 \pm 1.88^c$	$162 \pm 43.0^c$
Sitosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$9.05 \pm 3.19$	$3.91 \pm 1.12^c$	$2.92 \pm 0.85^c$	$14.4 \pm 4.45^c$
Campestanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.57 \pm 0.19$	$5.78 \pm 1.88^c$	$6.76 \pm 2.41^c$	$1.69 \pm 0.68^c$
Sitostanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.25 \pm 0.10$	$0.82 \pm 0.22^c$	$0.90 \pm 0.23^c$	$0.21 \pm 0.08$

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup>  $p \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $p \leq 0.001$  vs. Standard Futter

Wie im Plasma, so zeigte sich auch in der Leber eine signifikante Senkung der Phytosterolkonzentration bei Zufuhr von Phytostanolestern, welche in der höher dosierten Gruppe deutlicher war (Campesterol – 60 %,  $p = 0.000$ ; Sitosterol –71 %,  $p = 0.000$ ) als in der Gruppe mit 1.7 % Stanolestern (Campesterol – 53 %,  $p = 0.000$ ; Sitosterol –57 %,  $p = 0.000$ ). Die Konzentration des Campestanols nahm bei den Tieren unter 3.4 % Stanolestern im Vergleich zur Kontrolle um das 13-fache zu ( $p = 0.000$ ), Sitostanol stieg um das 4-fache ( $p = 0.000$ ) an.

Durch die Fütterung mit Sterolestern, kam es zu einem 7-fachen ( $p = 0.000$ ) Anstieg der Campesterolkonzentration in der Leber, und das Sitosterol erhöhte sich um das 1.2-fache ( $p = 0.020$ ). Die Konzentration an Campestanol stieg um mehr als das Doppelte ( $p = 0.000$ ), während die Konzentration an Sitostanol wie im Plasma zurückging ( $p = 0.011$ ).

Wie im Plasma, so war auch die Konzentration des Campestanols in der Leber bei einer zusätzlichen Fütterung mit 3.4 % Stanolestern um das 18-fache niedriger als die Campesterolkonzentration bei Fütterung mit 3.4 % Sterolestern. Der Gehalt an Sitostanol war hingegen nur 1.3-fach niedriger als der des Sitosterols.

## Galle

Da die Konzentration in der Gallenflüssigkeit nicht so konstant ist, wie die Konzentration im Blut, sondern durch das Volumen der Gallenflüssigkeit sehr stark variieren kann, ist hier nur die Auswertung der Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol möglich.

Da die biliäre Exkretionsrate der Sterole im Gegensatz zu ihrer Absorptionsrate steht, d.h. Sitosterol schneller ausgeschieden wird als Campesterol und Campesterol schneller als Cholesterol, war bei den Kaninchen die Standard Futter bekamen, die Ratio von Sitosterol zu Cholesterol ( $115 \pm 65.4 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) höher, als die von Campesterol zu Cholesterol ( $75.9 \pm 27.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) (Tab. 3.7). Bei der Fütterung mit 3.4 % Stanolestern oder Sterolestern änderte sich dieses Verhältnis. Die Campesterolkonzentration in der Galle stieg im Verhältnis zur Sitosterolkonzentration so stark an, dass die Ratio von Campesterol zu Cholesterol nun höher war als die von Sitosterol zu Cholesterol.

Bei der Fütterung mit Stanolestern kam es zu einer signifikanten Abnahme der Ratios von Campesterol/Cholesterol (1.7 % Stanolester: –59 %,  $p = 0.000$ ; 3.4 % Stanolester: –69 %,  $p = 0.000$ ) sowie von Sitosterol/Cholesterol (3.4 % Stanolester: –87 %,  $p = 0.000$ ). Die Ratio von Campestanol/Cholesterol stieg in beiden Gruppen hingegen um das 6-fache, die von Sitostanol/Cholesterol um das 2 - 3-fache an. Bei den Kaninchen, welche Sterolester gefüttert

bekamen, stieg hingegen die Ratio von Campesterol/Cholesterol im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 7-fache an ( $p = 0.000$ ). Das Verhältnis von Sitosterol/Cholesterol änderte sich nicht. Zudem zeigte sich, wie auch im Plasma und den Geweben, dass in dieser Gruppe neben den Phytosterolen auch vermehrt Stanole im Körper vorhanden waren. Die Ratio von Campestanol zu Cholesterol war demnach um das 3-fache höher ( $p = 0.000$ ) als in der Kontrollgruppe. Das Verhältnis von Sitostanol/Cholesterol hingegen war, wie im Plasma, signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren, die Standard Futter erhielten (2.2-fach,  $p = 0.000$ ). Ein Unterschied in der Cholesterolsynthese, zu erkennen an der Ratio von Lathosterol/Cholesterol, konnte bei der Fütterung von Phytosterolen oder Phytostanolen an homozygote WHHL-Kaninchen in der Galle nicht gezeigt werden.

Tabelle 3.7. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 18$ ,  $MW \pm SD$ , Sterolester  $n = 17$ )

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>Standard Futter</b>	<b>1.7 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Sterolester</b>
Lathosterol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$5.56 \pm 3.54$	$5.24 \pm 2.68$	$4.97 \pm 2.25$	$6.34 \pm 2.81$
Campesterol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$75.9 \pm 27.6$	$31.1 \pm 13.8^a$	$23.8 \pm 8.72^a$	$518 \pm 150^a$
Sitosterol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$115 \pm 65.4$	$62.5 \pm 87.7$	$15.2 \pm 5.11^a$	$123 \pm 43.8$
Campestanol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$18.3 \pm 7.74$	$113 \pm 45.9^a$	$117 \pm 30.7^a$	$51.2 \pm 14.1^a$
Sitostanol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$10.9 \pm 4.16$	$29.0 \pm 12.9^a$	$25.1 \pm 8.36^a$	$4.78 \pm 3.91^a$

<sup>a</sup>  $p \leq 0.001$  vs. Standard Futter

## **Intima der Aorta**

### **Biochemische Untersuchung**

Auch hier zeigte sich kein Unterschied in der Cholesterolkonzentration zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren, welche eines der angereicherten Futter bekamen (Tab. 3.8). Die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) war nur in der Sterolestergruppe

vergleichsweise höher (41 %,  $p = 0.004$ ) als in der mit Standard Futter gefütterten Kontrollgruppe.

Tabelle 3.8. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Intima der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 18$ ,  $MW \pm SD$ , Sterolester  $n = 17$ )

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>Standard Futter</b>	<b>1.7 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$94.3 \pm 45.1$	$82.4 \pm 29.6$	$94.5 \pm 30.4$	$117 \pm 31.5$
Lathosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.036 \pm 0.018$	$0.030 \pm 0.014$	$0.046 \pm 0.022$	$0.062 \pm 0.016^b$
Campesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$1.49 \pm 0.67$	$0.63 \pm 0.27^b$	$0.56 \pm 0.21^b$	$17.0 \pm 5.68^b$
Sitosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.59 \pm 0.27$	$0.23 \pm 0.07^b$	$0.22 \pm 0.06^b$	$1.35 \pm 0.35^b$
Campestanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$57.1 \pm 29.5$	$483 \pm 189^b$	$638 \pm 208^b$	$202 \pm 90.7^b$
Sitostanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$22.5 \pm 13.8$	$80.3 \pm 31.1^b$	$105 \pm 33.1^b$	$25.2 \pm 9.70$
Lathosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.39 \pm 0.16$	$0.36 \pm 0.13$	$0.49 \pm 0.22$	$0.55 \pm 0.14^a$
Campesterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$15.9 \pm 1.80$	$7.66 \pm 1.31^b$	$5.88 \pm 1.11^b$	$146 \pm 37.9^b$
Sitosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$6.38 \pm 1.48$	$2.84 \pm 0.73^b$	$2.43 \pm 0.49^b$	$11.8 \pm 2.69^b$
Campestanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.62 \pm 0.14$	$5.88 \pm 0.95^b$	$6.85 \pm 1.32^b$	$1.74 \pm 0.70^b$
Sitostanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.24 \pm 0.08$	$0.97 \pm 0.14^b$	$1.12 \pm 0.18^b$	$0.22 \pm 0.07$

<sup>a</sup>  $p \leq 0.01$ , <sup>b</sup>  $p \leq 0.001$  vs. Standard Futter

Die Phytostanolfütterung führte, wie im Plasma, zu einer Reduzierung der Konzentration der pflanzlichen Sterole in der Intima der Aorta. Auch hier war die Wirkung der höheren Dosis stärker (Campesterol  $-62\%$ ,  $p = 0.000$ ; Sitosterol  $-63\%$ ,  $p = 0.000$ ). Die Konzentration des Campestanols stieg im Vergleich zur Gruppe, die Standard Futter erhielt, bei der Dosierung von 3.4 % Stanolestern um das 11-fache ( $p = 0.000$ ) an, die Sitostanolkonzentration war fast

5 mal so hoch ( $p = 0.000$ ). Bei der Zufuhr von 1.7 % Stanolestern war die Zunahme etwas geringer.

Die Konzentration des Campesterols stieg bei den Tieren, welche mit Sterolestern versetztes Futter bekamen um das 11-fache ( $p = 0.000$ ), die des Sitosterols um das 2-fache ( $p = 0.000$ ) an. Brassicasterol ( $143 \pm 66.4$  ng/mg) und Stigmasterol ( $7.38 \pm 3.05$  ng/mg) waren im Vergleich dazu nur in geringen Mengen nachweisbar. Auch das Campestanol erhöhte sich bei dieser Gruppe fast um das 4-fache ( $p = 0.000$ ).

Die Campestanolkonzentration in der 3.4 % Stanolestergruppe, war um das 27-fache niedriger als die Konzentration an Campesterol in der 3.4 % Sterolestergruppe. Sitostanol war um das 13-fache niedriger als Sitosterol.

### Histologische Untersuchung der Aorta

Bei den homozygoten WHHL-Kaninchen waren es in der Gruppe mit Standard Futter und bei den mit Stanolestern gefütterten Tieren jeweils 14 von 18 Kaninchen, bei denen Plaques in der Aorta nachgewiesen werden konnten. In der Sterolestergruppe waren es 15 von 17 Tieren. Aufgrund der hohen Standardabweichung, gab es keinen signifikanten Unterschied in der Fläche der Plaques sowie bei der Ratio von Intima:Media zwischen den Gruppen (Tab. 3.9). Es war jedoch erkennbar, dass die Plaquefläche bei der zusätzlichen Fütterung von Sterolestern tendenziell größer war als bei der Fütterung mit Standard Futter. Durch die Gabe von Stanolestern war die Plaquefläche hingegen tendenziell kleiner.

Tabelle 3.9. Fläche der Plaques und die Ratio von Intima zu Media in der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 18$ , MW  $\pm$  SD, Sterolester  $n = 17$ ) \*

	Plaquefläche (mm <sup>2</sup> )	Ratio Intima : Media
Standard Futter	0.27 $\pm$ 0.39	0.13 $\pm$ 0.17
1.7 % Stanolester	0.18 $\pm$ 0.17	0.10 $\pm$ 0.09
3.4 % Stanolester	0.19 $\pm$ 0.18	0.10 $\pm$ 0.10
3.4 % Sterolester	0.38 $\pm$ 0.43	0.19 $\pm$ 0.22

\* the data used to perform the correlations is unpublished and may be subject to changes upon later publication and the data is owned by the Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soeborg, Denmark

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Cholesterol- und Phytosterol-/Stanolkonzentration in der Intima oder im Plasma und der Fläche der Plaques sowie der Ratio von Intima:Media, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

## **Gehirn**

Es zeigte sich, dass die Fütterung mit Sterol- oder Stanolestern keinen Einfluss auf die Cholesterolkonzentration im Gehirn der homozygoten Watanabe Kaninchen hatte (Tab. 3.10). Auch die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) wurde nicht beeinflusst.

Bemerkenswert war jedoch der Befund, dass pflanzliche Sterole und Stanole die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das Gehirn gelangen können. Wie in den anderen Geweben, verminderte die Zufuhr von pflanzlichen Stanolen die Konzentration der Sterole, wobei auch hier eine Dosisabhängigkeit der Wirkung erkannt werden konnte (1.7 % Stanolester: Campesterol -33 %,  $p = 0.000$ , Sitosterol -31 %,  $p = 0.000$ ; 3.4 % Stanolester: Campesterol -55 %,  $p = 0.000$ , Sitosterol -38 %,  $p = 0.000$ ). Die Stanolkonzentration im Hirn der Kaninchen dieser Gruppe stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe stark an (Campestanol 12-fach,  $p = 0.000$ ; Sitostanol 2-fach,  $p = 0.000$ ). In der 1.7 % Stanolestergruppe war dieser Anstieg entsprechend geringer.

Durch die zusätzliche Fütterung mit 3.4 % Sterolestern für 120 Tage, kam es im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einem 7-fachen Anstieg des Campesterols ( $p = 0.000$ ) und einem 1.4-fachen Anstieg des Sitosterols ( $p = 0.000$ ). Die Stigmasterol- ( $0.55 \pm 0.27$  ng/mg) und Brassicasterolkonzentration ( $4.02 \pm 1.08$  ng/mg) war im Vergleich dazu gering. Die Konzentration von Campestanol stieg bei der Fütterung mit Sterolestern im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 4-fache ( $p = 0.000$ ) an. Die Sitostanolkonzentration änderte sich nicht. Wie in den anderen Geweben, so stieg auch im Gehirn die Stanolkonzentration bei der Fütterung mit Stanolestern erheblich an, die Konzentration des Campestanols lag jedoch um das 30-fache niedriger als die Campesterolkonzentration bei der Sterolesterzufuhr. Bei Sitostanol war es das 12-fache gegenüber dem des Sitosterols.

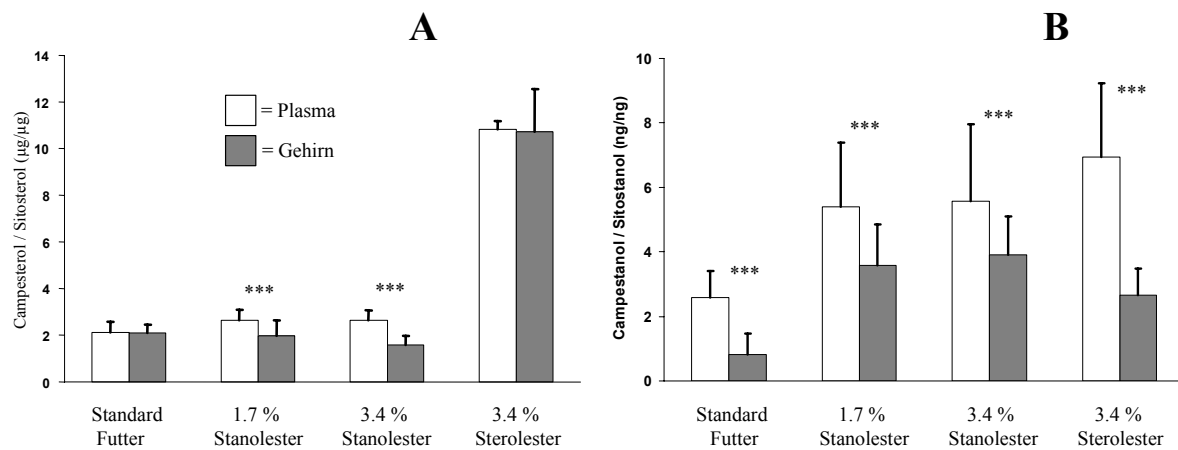
Tabelle 3.10. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 18, MW ± SD, Sterolester n = 17)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>Standard Futter</b>	<b>1.7 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Stanolester</b>	<b>3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	62.3 ± 9.67	65.2 ± 15.8	68.1 ± 8.04	67.2 ± 10.8
Lathosterol (µg/mg)	0.14 ± 0.04	0.14 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.06
Campesterol (µg/mg)	0.033 ± 0.008	0.022 ± 0.007 <sup>a</sup>	0.015 ± 0.005 <sup>a</sup>	0.231 ± 0.061 <sup>a</sup>
Sitosterol (µg/mg)	0.016 ± 0.004	0.011 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.022 ± 0.005 <sup>a</sup>
Campestanol (ng/mg)	0.59 ± 0.42	6.34 ± 2.32 <sup>a</sup>	7.35 ± 2.29 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.67 <sup>a</sup>
Sitostanol (ng/mg)	0.84 ± 0.26	1.83 ± 0.51 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.27
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.22 ± 0.44	2.17 ± 0.60	2.23 ± 0.52	2.35 ± 0.62
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.53 ± 0.09	0.33 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.43 ± 0.64 <sup>a</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.26 ± 0.04	0.18 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.05 <sup>a</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.010 ± 0.007	0.098 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.035 ± 0.008 <sup>a</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.013 ± 0.003	0.030 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.028 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.014 ± 0.003

<sup>a</sup> p ≤ 0.001 vs. Standard Futter

Überraschenderweise zeigte sich zwischen dem Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol und dem von Campestanol zu Sitostanol im Plasma und im Gehirn ein Unterschied (Abb. 3.3). Bei den Tieren, die zusätzlich 1.7 % Stanolester gefüttert bekamen, war das Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol im Plasma 1.3 mal höher als im Gehirn (p = 0.001), d.h. im Gehirn befand sich im Vergleich zum Plasma verhältnismäßig mehr Sitosterol und weniger Campesterol. Bei der Fütterung mit 3.4 % Stanolestern war das Verhältnis im Plasma 1.7 mal höher als im Gehirn (p = 0.000).





**Abbildung 3.3:** Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol (A) und von Campestanol zu Sitostanol (B) im Plasma und im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (MW  $\pm$  SD, n = 18, Sterolester n = 17) (\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ )

Deutlicher wird dieser Unterschied bei der Betrachtung der Ratio von Campestanol zu Sitostanol. In allen Gruppen war das Verhältnis von Campestanol zu Sitostanol im Plasma deutlich höher als das Verhältnis dieser beiden Substanzen im Gehirn. Im Gehirn war demnach im Vergleich zum Plasma im Verhältnis mehr Sitostanol und weniger Campestanol nachweisbar. Die größte Differenz war in der Kontrollgruppe zu finden. Hier war die Ratio Campestanol/Sitostanol im Plasma 3.2 mal höher als im Gehirn ( $p = 0.000$ ). In der Sterolestergruppe war es das 2.6-fache ( $p = 0.000$ ) und bei der Zufuhr von Stanolestern das 1.5-fache ( $p = 0.000$ ) im Vergleich zum Gehirn.

### 3.3.2 Heterozygote Watanabe Kaninchen

Da die zweite Serie der 120-Tages Studie um 30 Tage verlängert wurde, war es leider nicht möglich, die Daten beider Serien zusammenzufassen. Um die Übersicht zu bewahren und um Vergleiche mit der 120-Tages Studie mit homozygoten WHHL-Kaninchen anstellen zu können, wurden hier nur die Ergebnisse der ersten Serie der Studie an heterozygoten Kaninchen dargestellt. Ergebnisse der zweiten Serie über 150 Tage sind im Anhang zu finden (Tab. A19 – A23).

#### Plasmakonzentrationen

Im Plasma der heterozygoten WHHL-Kaninchen war nur in der Kontrollgruppe, welche Futter mit 0.2 % Cholesterol und ohne eine zusätzliche Anreicherung mit Phytosterolen oder Phytostanolen gefüttert bekam, ein 4.5-facher Anstieg der Cholesterolkonzentration im Plasma nach 120 Tagen nachweisbar ( $p = 0.013$ ) (Tab. 3.11). Durch die zusätzliche Fütterung mit hochdosierten Sterol- und Stanolestern konnte ein Anstieg der Cholesterolkonzentration im Plasma verhindert werden. Bei den mit 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Stanolestern gefütterten Tieren war der Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe am geringsten ( $18.8 \pm 97.6$  mg/dl,  $p = 0.016$ ). Die Cholesterolsynthese, dargestellt durch die Ratio von Lathosterol zu Cholesterol, ging bei allen Gruppen zurück. Anhand dieses Ergebnisses konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Zufuhr von pflanzlichen Sterolen oder Stanolen die Cholesterolsynthese beeinflusst.

Wie erwartet führte die Zufuhr von Phytostanolen zu einer signifikanten Senkung der Phytosterolkonzentration im Plasma, welche in den mit Cholesterol und 3.4 % Stanolestern gefütterten Tieren am deutlichsten zu erkennen war (Campesterol  $-68\%$ ,  $p = 0.005$ ; Sitosterol  $-67\%$ ,  $p = 0.003$ ). Die Konzentration der Phytostanole stieg bei den Tieren, welche mit Stanolestern angereichertes Futter bekamen, signifikant an. Seltsamerweise war der Anstieg in der Gruppe mit der niedrigeren Dosierung nach 120 Tagen höher als bei den Tieren, welche Cholesterol und 3.4 % Stanolester bekamen (0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester: Campestanol 16-fach,  $p = 0.008$ , Sitostanol 7-fach,  $p = 0.004$ ; 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester: Campestanol 12-fach,  $p = 0.001$ , Sitostanol 6-fach,  $p = 0.003$ ). Die Ratio von Campestanol oder von Sitostanol zu Cholesterol war jedoch aufgrund der niedrigeren Cholesterolkonzentration in der hochdosierten Stanolgruppe höher als bei der Zufuhr von 1.7 % Stanolestern.

Tabelle 3.11. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, MW ± SD)

Sterol/Stanol	0.2 % Cholesterol		0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester		0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester		0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester	
	Tag1	Tag 120	Tag1	Tag 120	Tag1	Tag 120	Tag1	Tag 120
Cholesterol (mg/dl)	107 ± 29.6	490 ± 370 <sup>a</sup>	127 ± 36.2	222 ± 164	139 ± 33.1	158 ± 85.2 <sup>d</sup>	123 ± 36.3	177 ± 115 <sup>d</sup>
Lathosterol (mg/dl)	0.09 ± 0.05	0.22 ± 0.19	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.07	0.10 ± 0.03	0.06 ± 0.02 <sup>a,d</sup>	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.08
Campesterol (mg/dl)	1.38 ± 0.37	2.22 ± 1.76	1.65 ± 0.37	0.83 ± 0.62 <sup>b,d</sup>	1.99 ± 0.55	0.63 ± 0.36 <sup>c,d</sup>	1.82 ± 0.38	20.3 ± 11.7 <sup>c,e</sup>
Sitosterol (mg/dl)	0.42 ± 0.15	0.65 ± 0.35	0.52 ± 0.17	0.29 ± 0.20 <sup>b,d</sup>	0.57 ± 0.18	0.19 ± 0.07 <sup>c,e</sup>	0.54 ± 0.11	1.39 ± 0.72 <sup>b,d</sup>
Campestanol (µg/dl)	31.8 ± 6.18	68.0 ± 47.1	41.6 ± 12.1	1109 ± 886 <sup>b,e</sup>	42.8 ± 15.9	817 ± 454 <sup>c,f</sup>	40.3 ± 9.69	229 ± 93.1 <sup>c,f</sup>
Sitostanol (µg/dl)	13.0 ± 2.83	16.0 ± 8.64	15.3 ± 3.57	111 ± 71.7 <sup>b,e</sup>	17.4 ± 8.17	100 ± 59.8 <sup>b,e</sup>	16.2 ± 2.91	25.3 ± 15.3
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	0.84 ± 0.22	0.41 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.89 ± 0.24	0.43 ± 0.11 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.14	0.43 ± 0.15 <sup>c</sup>	0.62 ± 0.25	0.50 ± 0.22 <sup>a</sup>
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	13.1 ± 1.63	4.51 ± 0.61 <sup>c</sup>	13.7 ± 4.04	3.67 ± 1.05 <sup>c</sup>	14.4 ± 3.03	3.99 ± 0.69 <sup>c</sup>	15.4 ± 3.13	123 ± 29.1 <sup>c,f</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	3.91 ± 0.88	1.71 ± 0.66 <sup>c</sup>	4.48 ± 2.10	1.40 ± 0.57 <sup>b</sup>	4.11 ± 0.95	1.33 ± 0.45 <sup>c</sup>	4.62 ± 1.25	8.81 ± 3.58 <sup>b,f</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.31 ± 0.10	0.16 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.12	4.91 ± 1.39 <sup>c,f</sup>	0.31 ± 0.09	5.29 ± 1.27 <sup>c,f</sup>	0.34 ± 0.09	1.56 ± 0.69 <sup>c,f</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.13 ± 0.05	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.13 ± 0.04	0.54 ± 0.19 <sup>c,f</sup>	0.12 ± 0.03	0.64 ± 0.18 <sup>c,f</sup>	0.14 ± 0.04	0.19 ± 0.19 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 120; <sup>d</sup> p ≤ 0.05, <sup>e</sup> p ≤ 0.01, <sup>f</sup> p ≤ 0.001 vs. Tag 120 der Kontrollgruppe (0.2 % Cholesterol)

Bei den heterozygoten Kaninchen, welche mit Cholesterol und Sterolestern gefüttert wurden, stieg die Campesterolkonzentration nach 120 Tagen um das 11-fache ( $p = 0.002$ ) an, das Sitosterol zeigte einen Anstieg um das 2.6-fache ( $p = 0.014$ ). Im Vergleich zu Tag 120 der Kontrollgruppe war es eine Erhöhung um jeweils das 9- bzw. das 2-fache. Stigmasterol ( $5.14 \pm 1.06 \mu\text{g}/\text{dl}$ ) und Brassicasterol ( $142 \pm 106 \mu\text{g}/\text{dl}$ ) lagen im Verhältnis dazu nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Wie bei den homozygoten WHHL-Kaninchen, so kam es auch bei den heterozygoten WHHL-Kaninchen zu einem fast 6-fachen Anstieg der Campestanolkonzentration durch die Fütterung mit Cholesterol und Sterolestern ( $p = 0.000$ ) über 120 Tage. Sie war um das 3-fache höher als in den Tieren, die zusätzlich nur Cholesterol bekamen ( $p = 0.000$ ). Der Gehalt an Sitostanol änderte sich nicht.

Trotz des enormen Anstiegs der Plasmakonzentrationen der Stanole bei Stanolfütterung, war die Konzentration des Campestanols in diesen Gruppen um das 18 - 24-fache niedriger als die Konzentration des Campesterols bei der Gabe von Sterolestern. Sitostanol war 13 mal niedriger als Sitosterol.

Der Vergleich von homozygoten und heterozygoten Watanabe Kaninchen zeigte, dass die homozygoten Kaninchen schon zu Beginn der Studien 10-fach höhere Plasma-Cholesterolkonzentrationen aufwiesen als die heterozygoten Kaninchen ( $1031 \pm 173 \text{ mg}/\text{dl}$  vs.  $107 \pm 29.6 \text{ mg}/\text{dl}$ ). Durch die Cholesterolfütterung der heterozygoten Tiere stieg deren Plasma-Cholesterolkonzentration etwas an, sie war jedoch immer noch deutlich niedriger als die Cholesterolkonzentration im Plasma der nicht mit Cholesterol gefütterten homozygoten WHHL-Kaninchen (Tab. 3.5 und 3.11). Auch die Plasmakonzentrationen der pflanzlichen Sterole und Stanole waren bei den heterozygoten Tieren deutlich niedriger als bei den homozygoten Kaninchen.

## **Leber**

In der Leber der heterozygoten Watanabe Kaninchen zeigte sich bei allen Tieren, die für 120 Tage mit Cholesterol und pflanzlichen Stanolen oder Sterolen angereicherte Futter bekamen, ein signifikanter Rückgang der Cholesterolkonzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren, die zusätzlich nur Cholesterol gefüttert bekamen (Tab. 3.12). Am deutlichsten war diese Abnahme in der Sterolgruppe (-57 %,  $p = 0.003$ ). Ein Unterschied in der Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) zwischen den Gruppen war nicht zu erkennen.

Wie im Plasma, so ging durch die Zufuhr von Stanolen auch die Phytosterolkonzentration in der Leber zurück. Hierbei spielte die Dosierung der Stanolester keine wesentliche Rolle. In

beiden Gruppen verminderte sich der Campesterolgehalt um knapp 50 %, das Sitosterol ging um 53 - 60 % zurück. Die Campestanolkonzentration war je nach Dosis bis zu 24 mal höher ( $p = 0.000$ ), die des Sitostanols um bis zu 6 mal höher ( $p = 0.001$ ).

Tabelle 3.12. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 9$ , MW  $\pm$  SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	14.0 $\pm$ 5.89	7.86 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>	7.35 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	6.04 $\pm$ 2.64 <sup>b</sup>
Lathosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.005 $\pm$ 0.002	0.004 $\pm$ 0.003	0.005 $\pm$ 0.004	0.008 $\pm$ 0.010
Campesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.050 $\pm$ 0.020	0.027 $\pm$ 0.017 <sup>a</sup>	0.026 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>	0.82 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>
Sitosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.015 $\pm$ 0.005	0.007 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.006 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	0.047 $\pm$ 0.017 <sup>c</sup>
Campestanol (ng/mg)	1.42 $\pm$ 0.44	26.7 $\pm$ 11.3 <sup>c</sup>	34.1 $\pm$ 18.1 <sup>c</sup>	8.36 $\pm$ 3.45 <sup>c</sup>
Sitostanol (ng/mg)	0.45 $\pm$ 0.13	2.53 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>	2.79 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	0.55 $\pm$ 0.27
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.37 $\pm$ 0.20	0.50 $\pm$ 0.41	0.83 $\pm$ 0.65	1.71 $\pm$ 2.82
Campesterol/ Cholesterol(ng/mg)	3.77 $\pm$ 0.87	3.29 $\pm$ 1.07	3.40 $\pm$ 1.34	142.5 $\pm$ 28.1 <sup>c</sup>
Sitosterin/ Cholesterol (ng/mg)	1.25 $\pm$ 0.72	0.86 $\pm$ 0.37	0.82 $\pm$ 0.43	8.48 $\pm$ 3.39 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.11 $\pm$ 0.04	3.38 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>	4.77 $\pm$ 1.60 <sup>c</sup>	1.45 $\pm$ 0.47 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.04 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	0.40 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	0.10 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup>  $p \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $p \leq 0.001$  vs. 0.2 % Cholesterol

In den mit Cholesterol und Sterolestern gefütterten Kaninchen erhöhte sich die Konzentration von Campesterol um das 16-fache ( $p = 0.000$ ), die des Sitosterols stieg um das 3-fache ( $p = 0.000$ ) an. Stigmasterol ( $0.20 \pm 0.06$  ng/mg) und Brassicasterol ( $6.19 \pm 2.80$  ng/mg) waren im Vergleich dazu nur in geringen Konzentrationen nachweisbar. Ebenso wie im

Plasma, stieg in der Leber bei der Zufuhr von Phytosterolen die Konzentration des Campestanols um das 6-fache ( $p = 0.000$ ). Die Sitostanolkonzentration änderte sich nicht, jedoch waren aufgrund der geringeren Cholesterolkonzentration sowohl die Ratio von Campestanol als auch die Ratio von Sitostanol zum Cholesterol signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Konzentration des Campestanols bei der Fütterung mit Cholesterol und Stanolestern war in der Leber der heterozygoten WHHL-Kaninchen 24 mal niedriger als die Konzentration des Campesterols bei der Fütterung mit Sterolestern. Das Sitostanol war 17 mal niedriger als das Sitosterol.

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen zeigte sich bei der Gruppe, welche lediglich Cholesterol und keine Phytosterole oder -stanole dazugefüttert bekam, eine 2 mal höhere Cholesterolkonzentration in der Leber als bei den homozygoten Kaninchen, welche kein Cholesterol bekamen. Durch die zusätzliche Gabe von Sterol- oder Stanolestern ging die Cholesterolkonzentration auf den Wert zurück, welcher in der Leber der nicht mit Cholesterol gefütterten homozygoten Tiere zu finden war (Tab. 3.6 und 3.12). Die Konzentration von pflanzlichen Sterolen und Stanolen war bei den homozygoten Tieren jedoch in allen Gruppen höher als bei den heterozygoten Kaninchen.

## Galle

Auch hier wurde aufgrund des variierenden Volumens der Galle nur die Ratio der Sterole und Stanole zum Cholesterol ausgewertet. Anders als bei den homozygoten Watanabe Kaninchen, war hier in jeder Gruppe die Ratio von Campesterol zu Cholesterol höher als die von Sitosterol zu Cholesterol (Tab. 3.13).

Es ließ sich jedoch beobachten, dass bei der Fütterung mit 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Stanolestern die Ratio von Campesterol und von Sitosterol zum Cholesterol geringer war als bei der Kontrollgruppe, die zusätzlich nur Cholesterol erhielt (Campesterol/Cholesterol -25 %,  $p = 0.041$ ; Sitosterol/Cholesterol -53 %,  $p = 0.000$ ). Die Ratio von Campestanol zu Cholesterol war hingegen 19 mal höher ( $p = 0.000$ ), die von Sitostanol zu Cholesterol 8 mal höher ( $p = 0.000$ ).

Bei den mit Cholesterol und mit Sterolestern gefütterten Kaninchen, war die Ratio von Campesterol zu Cholesterol um das 22-fache ( $p = 0.000$ ) höher und die des Sitosterols zum Cholesterol um das 5-fache ( $p = 0.000$ ) höher als bei den Kontrolltieren, die zusätzlich nur mit Cholesterol gefüttert wurden. Die Ratios der Stanole zum Cholesterol lagen in dieser

Gruppe ebenfalls über denen der Kontrolltiere (Campestanol/Cholesterol 9-fach,  $p = 0.000$ ; Sitostanol/Cholesterol 3-fach,  $p = 0.000$ ).

Ein Einfluss der Sterol- oder Stanolfütterung auf den Cholesterol-Synthesemarker Lathosterol/Cholesterol konnte in der Galle der heterozygoten Tiere nicht festgestellt werden.

Tabelle 3.13. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 9$ , MW  $\pm$  SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Lathosterol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	1.06 $\pm$ 0.82	1.68 $\pm$ 1.04	1.89 $\pm$ 1.01	2.20 $\pm$ 1.52
Campesterol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	20.4 $\pm$ 6.14	16.2 $\pm$ 4.63	15.3 $\pm$ 3.09 <sup>a</sup>	443 $\pm$ 114 <sup>b</sup>
Sitosterol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	17.7 $\pm$ 2.90	9.85 $\pm$ 2.90 <sup>b</sup>	8.35 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>	84.5 $\pm$ 26.5 <sup>b</sup>
Campestanol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	5.00 $\pm$ 1.07	69.6 $\pm$ 22.9 <sup>b</sup>	92.8 $\pm$ 30.5 <sup>b</sup>	44.1 $\pm$ 12.3 <sup>b</sup>
Sitostanol/ Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	1.79 $\pm$ 0.55	11.2 $\pm$ 3.71 <sup>b</sup>	14.9 $\pm$ 4.08 <sup>b</sup>	5.27 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup>  $p \leq 0.001$  vs. 0.2 % Cholesterol

## **Intima der Aorta**

### **Biochemische Untersuchung**

Bei den homozygoten Watanabe Kaninchen zeigte sich nach 120 Tagen bei allen Tieren, welche mit Cholesterol und Sterol- oder Stanolestern angereicherte Futter bekamen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche zusätzlich lediglich mit Cholesterol gefüttert wurden, eine signifikante Senkung der Cholesterolkonzentration in der Intima der Aorta (Tab. 3.14). Die größte Reduktion war in den mit 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Stanolestern gefütterten Tieren nachweisbar (-92 %,  $p = 0.013$ ), darauf folgte die Gruppe mit 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Sterolestern (-88 %,  $p = 0.016$ ). Die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) in der Intima der Aorta war hingegen in den Sterol-/Stanolgruppen 2 - 3 mal höher als in der Kontrollgruppe.

Bei der Fütterung mit Cholesterol und 1.7 % Stanolestern ging die Konzentration des Campesterols um 78 % zurück ( $p = 0.028$ ), bei der Zufuhr von Cholesterol und 3.4 % Stanolestern um 92 % ( $p = 0.011$ ). Beim Sitosterol war ein Rückgang von 80 % ( $p = 0.023$ ) bzw. 91 % ( $p = 0.010$ ) zu verzeichnen. Die Campestanolkonzentration stieg unter der Fütterung von 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Stanolestern um das 3-fache, die des Sitostanols änderte sich nicht. Die Ratios von Campestanol und von Sitostanol zum Cholesterol waren jedoch aufgrund der Senkung der Cholesterolkonzentration um das 18- bzw. 8-fache höher als in der Kontrollgruppe.

Tabelle 3.14. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 9$ ,  $MW \pm SD$ )

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$76.2 \pm 65.8$	$16.4 \pm 28.9^a$	$6.00 \pm 1.26^a$	$8.94 \pm 11.1^a$
Lathosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.016 \pm 0.009$	$0.008 \pm 0.004^a$	$0.008 \pm 0.003^a$	$0.009 \pm 0.003$
Campesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.28 \pm 0.24$	$0.062 \pm 0.134^a$	$0.023 \pm 0.004^a$	$0.83 \pm 1.11$
Sitosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$0.080 \pm 0.07$	$0.016 \pm 0.034^a$	$0.007 \pm 0.002^b$	$0.049 \pm 0.059$
Campestanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$8.53 \pm 5.37$	$57.3 \pm 118$	$22.0 \pm 5.92^c$	$12.9 \pm 13.6$
Sitostanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$2.62 \pm 1.86$	$8.40 \pm 16.9$	$2.44 \pm 0.60$	$1.16 \pm 1.51$
Lathosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.42 \pm 0.46$	$1.00 \pm 0.52^a$	$1.30 \pm 0.57^b$	$1.44 \pm 0.63^c$
Campesterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$3.91 \pm 0.71$	$2.66 \pm 1.06^b$	$3.78 \pm 0.34$	$89.6 \pm 17.1^c$
Sitosterin/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$1.24 \pm 0.40$	$0.77 \pm 0.26^b$	$1.21 \pm 0.29$	$5.69 \pm 1.27^c$
Campestanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.20 \pm 0.15$	$2.76 \pm 0.65^c$	$3.68 \pm 0.74^c$	$1.58 \pm 0.38^c$
Sitostanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	$0.05 \pm 0.02$	$0.42 \pm 0.15^c$	$0.41 \pm 0.06^c$	$0.13 \pm 0.050^c$

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup>  $p \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $p \leq 0.001$  vs. 0.2 % Cholesterol



Interessanterweise stiegen bei den mit Cholesterol und Sterolestern gefütterten Kaninchen die Campesterol- und Sitosterolkonzentrationen in der Intima der Aorta nicht signifikant an. Ein Grund dafür könnte die hohe Variation zwischen den Tieren und die damit verbundene hohe Standardabweichung sein. Die Betrachtung der Ratios der beiden Sterole zum Cholesterol zeigte jedoch eine starke Erhöhung (Campesterol/Cholesterol 23-fach,  $p = 0.000$ ; Sitosterol/Cholesterol 5-fach,  $p = 0.000$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche zusätzlich nur Cholesterol erhielt. Stigmasterol ( $0.65 \pm 0.37$  ng/mg) und Brassicasterol ( $6.97 \pm 10.7$  ng/mg) waren im Verhältnis zu Campesterol und Sitosterol nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Auch die Konzentration des Campestanols und Sitostanols war in der Intima der Sterolgruppe nicht erhöht. Die Ratios der beiden Stanole zum Cholesterol waren jedoch um das 8- bzw. 3-fache höher als bei der Kontrolle.

Trotz des starken Anstiegs des Campestanols in der 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Stanolestergruppe, war seine Konzentration um das 38-fache niedriger als die des Campesterols bei Fütterung mit Sterolestern. Für Sitostanol war es das 20-fache gegenüber dem des Sitosterols.

Bei den homozygoten Watanabe Kaninchen waren sowohl die Konzentration des Cholesterols als auch die Konzentrationen der Phytosterole und –stanole in der Intima der Aorta in allen Gruppen deutlich höher als bei den heterozygoten Kaninchen (Tab. 3.8 und 3.14).

### **Histologische Untersuchung der Aorta**

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen waren es in der Gruppe, die zusätzlich nur Cholesterol gefüttert bekam, fünf von neun Tieren, die Plaques entwickelten. Bei der Zufuhr von Cholesterol und 1.7 % Stanolestern war es lediglich ein Kaninchen und in der hochdosierten Sterol- und Stanolestergruppe hatte kein Kaninchen Plaques.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht nachgewiesen werden. Es war jedoch ersichtlich, dass durch die Zufuhr von hohen Mengen an Phytosterolen und –stanolen bei gleichzeitiger Cholesterolaufnahme, bei den heterozygoten Kaninchen eine Plaquebildung verhindert werden konnte (Tab. 3.15).

Bei den mit Cholesterol gefütterten Tieren gab es einen engen Zusammenhang zwischen der Cholesterolkonzentration in der Intima der Aorta und der Plaquefläche ( $r = 0.714$ ,  $p = 0.031$ ) sowie zwischen der Cholesterolkonzentration der Intima und der Ratio von Intima:Media ( $r = 0.690$ ,  $p = 0.040$ ). Gleiches galt für die Gruppe, die zusätzlich noch 1.7 % Stanolester

erhielt (jeweils  $r = 0.999$ ,  $p = 0.000$ ). Zwischen der Konzentration des Cholesterols im Plasma und der Plauefläche war bei diesen beiden Gruppen ebenfalls ein enger Zusammenhang zu erkennen ( $r = 0.723$ ,  $p = 0.028$ ;  $r = 0.749$ ,  $p = 0.020$ ). Entsprechend war auch die Korrelation zwischen dem Cholesterol im Plasma und der Ratio von Intima:Media ( $r = 0.718$ ,  $p = 0.029$ ;  $r = 0.749$ ,  $p = 0.020$ ). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Phytosterol- und -stanolkonzentration in der Intima oder im Plasma und der Plauefläche, konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3.15. Plauefläche und Ratio von Intima:Media in der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 9$ , MW  $\pm$  SD)\*

	<b>Plauefläche (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Ratio Intima : Media</b>
0.2 % Cholesterol	0.27 $\pm$ 0.47	0.16 $\pm$ 0.29
0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester	0.02 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.02
0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

\*the data used to perform the correlations is unpublished and may be subject to changes upon later publication and the data is owned by the Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soebork, Denmark

## Gehirn

Im Gehirn der heterozygoten WHHL-Kaninchen konnte überraschenderweise bei den Kaninchen, welche Cholesterol und 3.4 % Stanolester (-10 %,  $p = 0.048$ ) und bei den Tieren, welche Cholesterol und 3.4 % Sterolester erhielten (-16 %,  $p = 0.025$ ), eine signifikante Senkung der Cholesterolkonzentration gezeigt werden (Tab. 3.16). Die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) wurde in den beiden Gruppen jedoch nicht beeinflusst.

Beeindruckend war auch die Tatsache, dass im Gehirn, wie in den anderen Geweben, eine Senkung der Phytosterolkonzentration durch die Fütterung mit Stanolestern erreicht werden

konnte. Die Dosierung der Stanole spielte hier ebenfalls eine Rolle (0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester: Campesterol – 41 %,  $p = 0.002$ , Sitosterol –25 %,  $p = 0.002$ ; 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester: Campesterol –53 %,  $p = 0.000$ , Sitosterol –50 %,  $p = 0.000$ ). Merkwürdigerweise stieg die Konzentration des Campestanols in der niedriger dosierten Stanolgruppe um das 6.4-fache an ( $p = 0.000$ ), in der 3.4 % Stanolestergruppe jedoch nur um das 5.6-fache ( $p = 0.000$ ). Bei Sitostanol war es ähnlich (jeweils um das 2- bzw. 1.8-fache,  $p = 0.001$ ). Die Ratios der beiden Stanole zum Cholesterol waren hingegen in beiden Gruppen gleich.

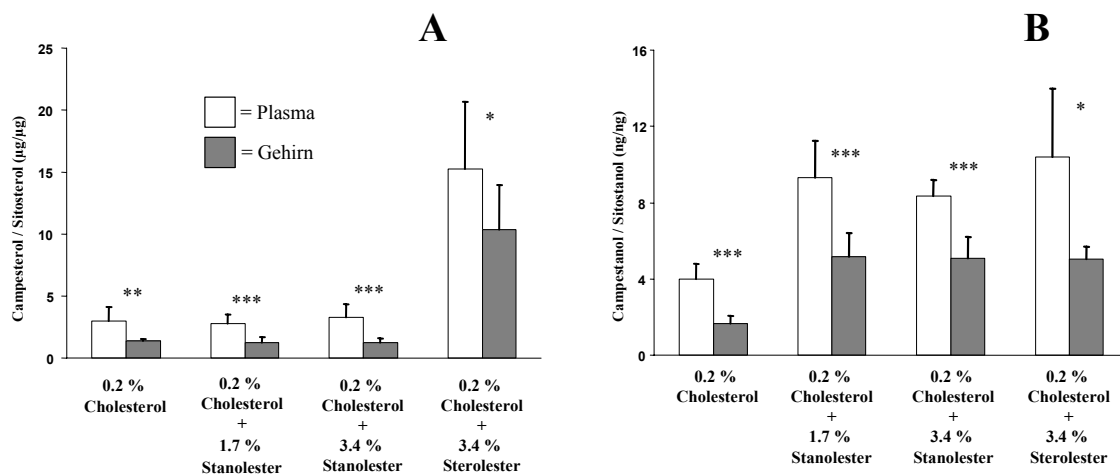
Tabelle 3.16. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratios zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern ( $n = 9$ , MW  $\pm$  SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	70.7 $\pm$ 8.24	73.6 $\pm$ 11.6	63.8 $\pm$ 4.66 <sup>a</sup>	59.7 $\pm$ 10.5 <sup>a</sup>
Lathosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.13 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.11 $\pm$ 0.02
Campesterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.017 $\pm$ 0.004	0.010 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.008 $\pm$ 0.002 <sup>c</sup>	0.20 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>
Sitosterol ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.012 $\pm$ 0.002	0.009 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.006 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.019 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>
Campestanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	0.71 $\pm$ 0.14	4.57 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	4.00 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>	3.00 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>
Sitostanol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	0.45 $\pm$ 0.12	0.90 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	0.81 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>	0.60 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
Lathosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	1.78 $\pm$ 0.23	1.46 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	1.61 $\pm$ 0.14	1.82 $\pm$ 0.20
Campesterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	0.24 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.12 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	3.36 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	0.17 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.33 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	0.01 $\pm$ 0.001	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol ( $\text{ng}/\text{mg}$ )	0.006 $\pm$ 0.002	0.012 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>	0.013 $\pm$ 0.004 <sup>c</sup>	0.010 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$ , <sup>b</sup>  $p \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $p \leq 0.001$  vs. 0.2 % Cholesterol

Durch die 120-tägige Fütterung von Cholesterin und Sterolestern erhöhte sich das Campesterol im Gehirn der heterozygoten Kaninchen um das 12-fache ( $p = 0.000$ ), das Sitosterol um das 1.6-fache ( $p = 0.000$ ). Die Konzentration von Stigmasterol ( $0.57 \pm 0.16$  ng/mg) und von Brassicasterol ( $4.04 \pm 1.07$  ng/mg) blieb dagegen verhältnismäßig niedrig. Die Campestanol- und Sitostanolkonzentration im Gehirn dieser Tier nahm bei der Zufuhr von Sterolestern um das 4-fache ( $p = 0.000$ ) bzw. 1.3-fache ( $p = 0.018$ ) zu.

Wie in den anderen Geweben, so stieg auch im Gehirn der Kaninchen die Stanolkonzentration bei der Fütterung mit Stanolestern erheblich an. Die Campestanolkonzentration war jedoch immer noch um das 44 - 50-fache niedriger als die Konzentration an Campesterol bei der Fütterung mit Sterolestern. Sitostanol war um das 21 - 23-fache niedriger als Sitosterol.



**Abbildung 3.4:** Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol (A) und von Campestanol zu Sitostanol (B) im Plasma und im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 120-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtermitteln (MW  $\pm$  SD, n = 9) (\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ )

---

Interessant war auch die Beobachtung, dass obwohl die Konzentration des Cholesterols und der Sterole und Stanole im Plasma der homozygoten Watanabe Kaninchen um ungefähr das 10-fache höher waren als bei den heterozygoten Kaninchen, die Konzentration dieser Substanzen im Gehirn nur noch um das 1 - 2-fache höher war (Tab. 3.10 und 3.16).

Bei den heterozygoten WHHL-Kaninchen konnte, wie bei den homozygoten Tieren, ein geringeres Verhältnis von Campesterol zu Sitosterol im Gehirn im Vergleich zum Plasma nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Am größten war die Differenz bei der Fütterung mit 0.2 % Cholesterol und 3.4 % Stanolestern (2.6-fach,  $p = 0.000$ ), am geringsten bei der Zufuhr von Cholesterol und Sterolestern (1.5-fach,  $p = 0.027$ ). Im Gehirn der heterozygoten Watanabe Kaninchen war demnach im Vergleich zum Plasma verhältnismäßig mehr Sitosterol als Campesterol nachweisbar. Gleiches zeigt die Betrachtung des Verhältnisses von Campestanol zu Sitostanol. Es war im Plasma der Kaninchen 1.6 – 2.4 mal höher als im Gehirn ( $p = 0.000$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Wirkung der Phytosterol- und Phytostanolfütterung auf die Zirkulation

Erhöhte Plasma-Cholesterolkonzentrationen sind ein Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Durch eine Senkung der Gesamt-Cholesterolkonzentration um 10 % kann die Inzidenz ischämischer Herzkrankheiten bei 55 – 64-jährigen Männern im Mittel um 38 % gesenkt werden (Law *et al.*, 1994). Die wichtigste Voraussetzung zur Senkung des Cholesterols zur Verhinderung einer koronaren Herzerkrankung ist eine gesunde Ernährung. Seit einigen Jahren werden in der EU vermehrt Lebensmittel mit Phytosterolen oder Phytostanolen angereichert, da man durch die Aufnahme dieser Sterole und Stanole die Cholesterolkonzentration signifikant senken kann. Zum Beispiel senkt eine Zufuhr von 2 - 3 g Sitostanol pro Tag das Gesamt-Plasmacholesterol um 10 % und das LDL-Cholesterol um 10 - 15 % (Miettinen *et al.*, 1995; Nguyen, 1999).

Laut der von der EU genehmigten Zusammensetzung der Phytosterole bei der Anreicherung von Lebensmitteln, darf Brassicasterol einen Gehalt von 3 % nicht überschreiten (SCF, 2003). Die Phytosterolmischung, die zur Anreicherung des Futters der vorliegenden Untersuchungen genutzt wurde, ist somit aufgrund ihres erhöhten Brassicasterolgehaltes (10 %) derzeit nicht für die Vermarktung in der EU zugelassen.

Es werden heutzutage mehrere Möglichkeiten diskutiert, wie die Phytosterole die Cholesterolkonzentration im Plasma senken. Zum einen beeinflussen sie die Mizellenzusammensetzung und verdrängen das Cholesterol aus den Mizellen. Dies ist mit einer verringerten Cholesterolresorption im Darm verbunden (Ikeda *et al.*, 1989; Heinemann *et al.*, 1991; Mel'nikov *et al.*, 2004). Zum anderen besteht die Möglichkeit der Stimulation der Sterol-Efflux-Transporter (Plat & Mensink, 2002; Kaneko *et al.*, 2003). Zudem resultiert eine geringere Cholesterolabsorption in einer verminderten Konzentration des zirkulierenden Cholesterols, womit eine erhöhte Cholesterolsynthese sowie eine vermehrte Expression der LDL-Rezeptoren verbunden ist (Plat & Mensink, 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die cholesterolsenkende Wirkung der Phytosterole und -stanole hauptsächlich auf der Verminderung der Cholesterolaufnahme im Darm beruht. Bei den heterozygoten Kaninchen, welche Cholesterol in Kombination mit 3.4 % Sterol- oder Stanolestern gefüttert bekamen, war die Cholesterolkonzentration im Plasma nach 120 Tagen deutlich niedriger als bei den Kaninchen, die nur Cholesterol hinzugefüttert bekamen (Tab. 3.11). Bei den homozygoten Kaninchen, welche kein Cholesterol erhielten, war

lediglich in der Sterolestergruppe eine Erniedrigung der Cholesterolkonzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erkennen (Tab. 3.5). In den anderen Gruppen änderte sich nichts. Es gibt zwei mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse: 1) Phytosterole und Phytostanole vermindern die Cholesterolresorption durch eine Verdrängung des Cholesterols aus den Mizellen (Ikeda *et al.*, 1989; Mel'nikov *et al.*, 2004). Da die homozygoten Kaninchen aber kein Cholesterol gefüttert bekamen, konnte auch kein Effekt der pflanzlichen Sterole und Stanole auf die Aufnahme des Nahrungscholesterols erwartet werden. Zudem könnte bei den homozygoten WHHL-Kaninchen die Ausscheidung des biliären Cholesterols vermindert sein, da die Cholesterolkonzentration in der Leber, trotz deutlich höherer Plasma-Cholesterolkonzentrationen der homozygoten Tiere, gleich hoch bzw. sogar niedriger war als die Cholesterolkonzentration in der Leber der heterozygoten Tiere. Dadurch konnte nur sehr wenig Cholesterol in den Verdauungstrakt gelangen. 2) Wenn durch die Aufnahme von Phytosterolen und -stanolen die Cholesterolresorption vermindert wird, erhöht sich die Zahl der LDL-Rezeptoren und die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wird stimuliert. Homozygote Watanabe Kaninchen können aber die Zahl ihrer LDL-Rezeptoren nicht erhöhen und somit kann die Plasma-Cholesterolkonzentration auch nicht sinken (Xu *et al.*, 1995).

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen, welche 1.7 % Stanolester in Kombination mit Cholesterol bekamen, konnte die Cholesterolkonzentration nach 120 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant gesenkt werden. Diese Dosierung reichte scheinbar nicht aus, um einen Einfluss auf die Cholesterolresorption auszuüben. Bei der Zufuhr von 3.4 % Stanolestern hingegen, war das Plasma-Cholesterol an Tag 120 deutlich niedriger als bei den Kontrolltieren. In einer Studie von Hallikainen *et al.* (2000b) wurde die maximale Senkung der Plasma-Cholesterol- und LDL-Konzentration beim Menschen bei einer Zufuhr von 1.6 g Sitostanol pro Tag erreicht. Durch eine Erhöhung der Sitostanolzufuhr auf 2.4 g und 3.2 g/Tag konnte kein zusätzlicher Effekt erreicht werden. Bei den Watanabe Kaninchen der vorliegenden Untersuchung zeigte sich somit eine stärkere dosis-abhängige Wirkung der Phytostanole als beim Menschen.

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen konnte durch die Zufuhr von 3.4 % Stanolestern der Anstieg der Cholesterolkonzentration, bedingt durch die alimentäre Zufuhr von Cholesterol, am deutlichsten vermindert werden ( $18.8 \pm 97.6$  mg/dl). Bei der Gabe von 3.4 % Sterolestern stieg das Plasma-Cholesterol um  $54.6 \pm 98.4$  mg/dl an. Schon 1977 entdeckten Sugano *et al.*, dass Phytostanole die Plasma-Cholesterolkonzentration deutlicher senken als Phytosterole. Im Jahre 1991 wiesen Heinemann *et al.* nach, dass Sitosterol die

Cholesterolabsorption um 50 % senkt, Sitostanol hingegen um 85 %. Zusätzlich konnte von unveresterten Sitostanol, verglichen mit Sitosterol, eine signifikant stärkere Verminderung des LDL-Cholesterols bei Kindern mit familiärer Hypercholesterolämie nachgewiesen werden (Becker *et al.*, 1993). Als Ursache wird eine höhere Hydrophobität der Sterole, also ein Unterschied in der Polarität und somit eine unterschiedliche Wirkung auf die Mizellenzusammensetzung genannt. Andere Studien zeigten jedoch keinen Unterschied in der Wirkung von pflanzlichen Sterolen und Stanolen auf die Cholesterolkonzentration im Plasma (Weststrate & Meijer, 1998; Hallikainen *et al.*, 2000a). Die Reduktion der LDL-Konzentration lag sowohl bei der Zufuhr von Sterolester, als auch von Stanolester Margarine, zwischen 10 % und 13 %. Hierbei spielte die Dauer der Verabreichung aber eine entscheidende Rolle. Bei Studien, die über einen Zeitraum von vier Wochen angelegt waren und bei denen täglich zwischen 1.6 und 3.1 g Phytosterole oder Phytostanole aufgenommen wurden, zeigte sich kein Unterschied in der Wirkung von Sterolen und Stanolen. Dauerten die Studien aber zwischen 6 und 13 Wochen, so schien die LDL-Cholesterol senkende Wirkung der Phytosterole mit der Zeit abzunehmen, während die Wirkung der Phytostanole über die gesamte Dauer konstant blieb (O'Neill *et al.*, 2005).

Die Cholesterolsynthese, dargestellt anhand des Cholesterol-Synthesemarkers Lathosterol/Cholesterol, ging sowohl bei den heterozygoten als auch bei den homozygoten Tieren nach 120 Tagen zurück, unabhängig davon, welche Diät sie bekamen. Somit scheint dieser biochemische Marker für eine Beantwortung der Frage, ob die Fütterung von Cholesterol und von Phytosterol- und Phytostanolestern einen Einfluss auf die Cholesterolsynthese bei Watanabe Kaninchen hat, nicht aussagekräftig genug zu sein. Da in früheren Studien bewiesen wurde, dass die Cholesterolsynthese bei Kaninchen mit dem Alter abnimmt (Dietschy *et al.*, 1983), könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf diesem physiologischen Effekt beruhen.

Bei dem Vergleich der verschiedenen Diät-Gruppen der heterozygoten und homozygoten WHHL-Kaninchen zeigte sich nur im Plasma der homozygoten Watanabe Kaninchen, die mit 3.4 % Sterolestern gefüttert wurden, eine signifikant höhere Cholesterolsynthese im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 3.5). Sowohl im Plasma als auch in der Leber und der Galle der anderen Tiere, gab es keinen signifikanten Unterschied in der Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) zwischen den Diät-Gruppen. In den hochdosierten Sterol- und Stanolester-Diäten war die Synthese lediglich tendenziell höher als bei den Kontrollgruppen. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnte aber kein signifikanter Unterschied erreicht werden. Ein Einfluss der Phytosterole und -stanole auf die Cholesterolsynthese



konnte anhand des Markers Lathosterol/Cholesterol in der vorliegenden Arbeit somit nicht bewiesen werden. Zahlreiche andere Studien nutzten ebenfalls die Ratio von Lathosterol/Cholesterol als Synthesemarker und konnten einen Anstieg der Cholesterolsynthese von 10 – 20 % nach der Zufuhr von Phytosterolen (Hallikainen *et al.*, 2000a; Nestel *et al.*, 2001) oder Phytostanolen (Vanhanen *et al.*, 1993; Hallikainen *et al.*, 2000a; Mensink *et al.*, 2002) feststellen. Dass in der vorliegenden Arbeit bei den heterozygoten Kaninchen kein signifikanter Unterschied zwischen den Diät-Gruppen festgestellt werden konnten, lag möglicherweise auch daran, dass alle Tiere Cholesterol gefüttert bekamen, und durch die Phytosterol/-stanolfütterung die Cholesterolkonzentration nicht soweit gesenkt werden konnte, dass die Synthese angeregt wurde. Ein Vergleich mit heterozygoten Kaninchen, die nicht mit Cholesterol gefüttert wurden, hätte vielleicht andere Ergebnisse geliefert. Bei den homozygoten Tieren war kein Einfluss der Phytosterole/-stanole auf die Plasma-Cholesterolkonzentration nachweisbar. Die Cholesterolkonzentration im Plasma blieb bei allen Gruppen, auch ohne eine alimentäre Zufuhr von Cholesterol, sehr hoch. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass auch die Cholesterolsynthese bei diesen Tieren nicht beeinflusst wurde.

Besonders bei den heterozygoten Kaninchen gab es eine hohe Standardabweichung innerhalb der Gruppen. Die Plasma-Cholesterolkonzentration bei den mit 0.2 % Cholesterol gefütterten Kaninchen reichte beispielsweise von unter 100 mg/dl bis über 1000 mg/dl. Daher war es oft nicht möglich, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu erreichen. Möglicherweise war die zu Beginn der Studien durchgeführte Einteilung der Kaninchen in heterozygot und homozygot, anhand der Plasma-Cholesterol- und Triglyzeridkonzentration, nicht präzise genug. Sicherlich wäre es genauer gewesen, den Genotyp mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) zu ermitteln (Sun *et al.*, 2002). Es wäre aber auch möglich, dass es bei den Watanabe Kaninchen, genauso wie bei den Menschen, Hyper- und Hyporesponder gibt. Das heißt, die Cholesterolresorption ist genetisch festgelegt und manche Menschen oder Tiere zeichnen sich durch eine hohe Resorption (Hyperresponder) und manche durch eine geringe Resorption aus (Hyporesponder) (Thuluva *et al.*, 2005).

Wie schon in früheren Studien beschrieben, konnte durch die orale Applikation von Phytostanolen die Plasmakonzentration der Phytosterole signifikant gesenkt werden (Miettinen *et al.*, 1995; Gylling *et al.*, 1999; Hallikainen *et al.*, 2000a). Die Zufuhr von 3.4 % der Stanolester war hier wirkungsvoller als die Fütterung von nur 1.7 % der entsprechenden Stanole. Bei der Gabe von 3.4 % Stanolestern war die Senkung des Campesterols und des Sitosterols um 13 – 27 % höher als bei der Diät mit 1.7 % der Stanolester. Bei der Zufuhr von

Sterolestern hingegen, kam es neben einem Anstieg der Phytosterolkonzentrationen im Plasma auch zu einem Anstieg der Phytostanolkonzentration (Tab. 3.5 und 3.11). Sicherlich enthält das Futter, welches mit Sterolestern angereichert wurde auch geringe Mengen an Stanolen, die vermutlich während der Produktion entstanden sind (Tab. 3.2). Andere Studien zeigten jedoch auch, dass die Stanole Campestanol und Sitostanol im Körper durch Hydrierung aus den ungesättigten Vorstufen Campesterol und Sitosterol entstehen können, wie dies auch für die Umwandlung von Cholesterol zu Cholestanol nachgewiesen wurde (Salen *et al.*, 1985b).

Bemerkenswert war, dass die Phytostanolkonzentration nach der Zufuhr der Stanolester zwar stark anstieg, die Konzentration der Stanole war im Vergleich zu der Konzentration der Sterole bei der Zufuhr von Sterolestern jedoch um ein Vielfaches niedriger. Bei den heterozygoten Tieren war die Campestanolkonzentration im Plasma bei der Zufuhr von 3.4 % Stanolestern um das 18 – 24-fache geringer als die Campesterolkonzentration bei Fütterung mit 3.4 % Sterolestern. Die Konzentration von Sitostanol war 13 mal niedriger als die des Sitosterols. Ähnlich sah auch das Verhältnis bei den homozygoten WHHL-Kaninchen aus. Auch bei Patienten mit Hypercholesterolämie war durch eine Zufuhr von ungefähr 2 g Phytosterolen pro Tag über 4 Wochen die Phytosterolkonzentration im Plasma 15 mal höher als die Phytostanolkonzentration bei Aufnahme von 2 g pflanzlicher Stanole über 4 Wochen (Hallikainen *et al.*, 2000a).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist die Anreicherung von Lebensmitteln mit Stanolestern zur Senkung der Plasma-Cholesterolkonzentration als günstiger anzusehen als eine Anreicherung mit Sterolestern. Die Senkung der Cholesterolkonzentration im Plasma war effektiver, zudem stieg die Plasmakonzentration der Stanole bei deren Aufnahme, im Vergleich zu den Sterolen bei der Fütterung mit Sterolestern, nicht so stark an. Außerdem konnte durch die Zufuhr von Stanolestern neben dem Cholesterol auch die Konzentration der Phytosterole gesenkt werden.

Bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass die Phytosterolkonzentration im menschlichen Plasma deutlich geringer ist als bei den hier untersuchten Watanabe Kaninchen. Eine dreimal tägliche Aufnahme von 0.5 g Sitostanol über eine Woche, erhöhte die Campestanolkonzentration bei zehn gesunden Probanden von  $2.14 \pm 0.89 \mu\text{g/dl}$  auf  $6.35 \pm 2.98 \mu\text{g/dl}$ , Sitostanol stieg von  $2.01 \pm 1.18 \mu\text{g/dl}$  auf  $8.97 \pm 5.21 \mu\text{g/dl}$  (Sudhop *et al.*, 2003). Eine Gabe von 0.5 g Sitosterol 3 mal pro Tag, erhöhte die Sitosterolkonzentration von  $0.115 \pm 0.029 \text{ mg/dl}$  auf  $0.139 \pm 0.043 \text{ mg/dl}$ , der Campesterolgehalt stieg von  $0.196 \pm 0.059 \text{ mg/dl}$  auf  $0.212 \pm 0.063 \text{ mg/dl}$  (Prange, 2001). Bei

den heterozygoten Kaninchen der vorliegenden Studie, die Futter erhielten, welches nicht mit Phytosterolen und Phytostanolen angereichert wurde, waren die Sterolkonzentrationen im Plasma schon um das 5 – 10-fache höher und die Stanolkonzentrationen um das 3 – 6-fache höher als bei den menschlichen Probanden der Untersuchung von Prange (2000). Betrachtet man die Tiere, welche die angereicherten Futter erhielten, und im Gegensatz dazu noch die homozygoten Watanabe Kaninchen, so war die Differenz noch größer. Die Tiere der vorliegenden Untersuchung bekamen aber zum Teil auch eine 25 mal höhere Sterol- oder Stanoldosis verabreicht als die für den Menschen empfohlene Menge von 2 – 3 g/Tag.

Normalerweise steht die biliäre Exkretionsrate im Gegensatz zu ihrer Absorptionsrate, d.h. Sitosterol wird schneller ausgeschieden als Campesterol und Campesterol schneller als Cholesterol (Sudhop & von Bergmann, 2002; Igel *et al.*, 2003). Bei den homozygoten WHHL-Kaninchen, die das Standard Futter oder das Futter mit der niedrigen Stanoldosis erhielten, war die Ratio von Campesterol zu Cholesterol demnach um das 1.5 – 2-fache niedriger als die Ratio von Sitosterol zu Cholesterol (Tab. 3.7). Durch die Anreicherung des Futters mit 3.4 % Stanol- oder Sterolestern, kam es zu einer Verschiebung dieses Verhältnisses zu Gunsten des Campesterols. Bei der zusätzlichen Fütterung mit Sterolestern war die Ratio von Campesterol/Cholesterol vier mal größer als die von Sitosterol/Cholesterol. Bei den heterozygoten Tieren, welche zusätzlich Cholesterol oder Cholesterol in Kombination mit zwei verschiedenen Dosierungen von Phytostanolen bekamen, war die Ratio von Campesterol/Cholesterol 1.2 – 1.8 mal größer als die von Sitosterol/Cholesterol. Bei einer Zufuhr von Cholesterol und 3.4 % Sterolestern war sie sogar 5 mal höher. Ursache ist der deutlich höhere Anstieg der Campesterolkonzentration im Vergleich zur Sitosterolkonzentration im Plasma der mit den angereicherten Diäten gefütterten Tiere.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Watanabe Kaninchen durch die Anreicherung der Nahrung mit Phytosterol- oder Phytostanolestern bei gleichzeitiger Cholesterolgabe, ein Anstieg der Plasma-Cholesterolkonzentration verhindert werden konnte. Phytostanole hatten eine stärkere cholesterolsenkende Wirkung als Phytosterole und auch die Dosierung spielte hier eine Rolle. Ob die Fütterung mit Sterol- oder Stanolestern einen Einfluss auf die Cholesterolsynthese hatte, konnte anhand des Synthesemarkers Lathosterol/Cholesterol nicht eindeutig bewiesen werden. Phytostanole verminderten die Konzentration der Phytosterole. Zudem war die Konzentration der Stanole bei der Fütterung mit Stanolestern deutlich geringer als die Konzentration der Sterole bei Fütterung mit Sterolestern.

#### 4.2 Einfluss der Phytosterol- und Phytostanolfütterung auf die Arteriosklerose

Arteriosklerose und damit verbundene Herz-Kreislauf Erkrankungen gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die Hypercholesterolämie ist eine der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose. Zahlreiche Studien haben bewiesen, dass durch die Senkung der Plasma-Cholesterolkonzentration eine deutliche Verringerung der arteriellen Lipidakkumulation und eine Verminderung der Entstehung arterieller Plaques erreicht werden kann (Ikeda *et al.*, 1981; Shiomi *et al.*, 1990; Kroon *et al.*, 1993; Moghadasian *et al.*, 1997; Ntanos *et al.*, 1998). Bei Watanabe Kaninchen beispielsweise konnte durch die Senkung des Plasma-Cholesterols um 51 % mit Hilfe des HMG-CoA-Reduktase Hemmers Pravastatin ein Rückgang des Auftretens von arteriosklerotischen Läsionen um 10 - 30 % beobachtet werden (Kroon *et al.*, 1993). Bei der Senkung des Plasma-Cholesterols um 60 % war die Ausprägung der Arteriosklerose bei WHHL-Kaninchen noch geringer (Shiomi *et al.*, 1990). Bei einer Untersuchung von Wilson *et al.* (1982) konnte ebenfalls ein enger Zusammenhang zwischen der Plasma-Cholesterolkonzentration und der Arteriosklerose gezeigt werden. Bei Kaninchen mit einer Plasma-Cholesterolkonzentration von über 300 mg/dl war die Arteriosklerose sehr stark ausgeprägt, bei Kaninchen mit einem Plasma-Cholesterol von unter 150 mg/dl nur sehr minimal. Bei ApoE defizienten Mäusen konnte durch eine Senkung des LDL-Cholesterols um 20 % die Plauefläche um 50 % verkleinert werden (Moghadasian *et al.*, 1999b). Beim Menschen hat sich durch die Verminderung des Plasma-Cholesterols von  $144 \pm 26$  mg/dl auf  $130 \pm 18$  mg/dl die durchschnittliche Dicke der Intima der Halsschlagader von  $0.739 \pm 0.114$  mm auf  $0.726 \pm 0.115$  mm reduziert (Shukla *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Untersuchung konnten aufgrund der großen Streuung der Werte keine signifikanten Unterschiede in der Plauefläche zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Erkennbar war jedoch, dass bei den heterozygoten Tieren, welche zusätzlich mit Cholesterol gefüttert wurden und Plasma-Cholesterolkonzentrationen von  $490 \pm 370$  mg/dl sowie eine Cholesterolkonzentration in der Intima der Aorta von  $76.2 \pm 65.8$  µg/mg aufwiesen, fünf von neun Tieren Plaques entwickelten. Wurde die Cholesterolkonzentration im Plasma durch eine zusätzliche Fütterung mit 3.4 % Phytosterol-/Phytostanolestern auf unter 200 mg/dl und in der Intima der Aorta auf unter 10 µg/mg gesenkt, so konnte bei keinem der Tiere eine Plaueentwicklung nachgewiesen werden (Tab. 3.15). Zudem konnte, wie auch schon in anderen Experimenten bewiesen wurde (Daley *et al.*, 1994), eine starke Korrelation zwischen der Cholesterolkonzentration in der Intima der Aorta oder im Plasma und der Plauefläche bzw. der Ratio von Intima zu Media festgestellt werden. Da bei den homozygoten Watanabe Kaninchen, die aufgrund ihrer hohen Plasma-Cholesterolkonzentrationen kein Cholesterol

hinzugefüttert bekamen, eine Senkung des Plasma-Cholesterols durch Gabe von Phytosterolen/-stanolen nicht möglich war, entwickelten hier die Kaninchen in allen Gruppen Plaques (Tab. 3.9).

In der vorliegenden Untersuchung konnte bei den heterozygoten Kaninchen gezeigt werden, dass durch eine Zufuhr von Phytosterol- oder Phytostanolestern das Risiko der Entstehung einer Arteriosklerose vermindert werden könnte. Vergleichbare Daten über die Wirkung von Phytosterolen/-stanolen auf die Entstehung der Arteriosklerose bei Watanabe Kaninchen sind bis zum heutigen Zeitpunkt in der Literatur nicht zu finden. Zahlreiche Studien bei anderen Tieren bestätigen jedoch, dass eine Anreicherung der Nahrung mit Phytosterolen und Phytostanolen die Plaquebildung reduziert. Bei weißen Neuseeland Kaninchen wurde die Plaquebildung bei einer Zufuhr von 0.64 g Sitostanol pro Tag fast vollständig verhindert (Ntanios *et al.*, 1998). Bei ApoE defizienten Mäusen konnte die Plaquefläche in der Aorta durch die Fütterung mit 2 % Phytosterolen von  $0.4 \pm 0.1 \text{ mm}^2$  auf  $0.2 \pm 0.1 \text{ mm}^2$  vermindert werden (Moghadasian *et al.*, 1999b). In einer anderen Studie verringerten sich die Läsionen bei diesen Tieren um 60 % (Nashed *et al.*, 2005). Durch die Fütterung von Phytosterolen oder -stanolen an LDL-Rezeptor defiziente Mäuse, konnte die Bildung arteriosklerotischer Läsionen ebenfalls vermindert werden (Plat *et al.*, 2006).

Bei der Zufuhr von Phytosterolen konnten bei den heterozygoten und bei den homozygoten WHHL-Kaninchen erhöhte Konzentrationen von Campesterol und bei den homozygoten Kaninchen von Sitosterol in der Intima der Aorta nachgewiesen werden (Tab. 3.8 und 3.14). Die Campesterolkonzentration bei den homozygoten WHHL-Kaninchen war jedoch 20 mal höher als bei den heterozygoten Kaninchen. Die Phytosterolkonzentration in der Intima konnte bei beiden Genotypen durch die Zufuhr von Phytostanolen signifikant gesenkt werden. Auch bei einer Untersuchung von Kritchevsky *et al.* (2003) wurden bei gesunden Kaninchen, die mit Phytosterolestern gefüttert wurden, im Vergleich zu Kontrolltieren, erhöhte Konzentrationen an Sitosterol und Campesterol in der Aorta nachgewiesen (1394 ng/Aorta vs. 1319 ng/Aorta, bzw. 4361 ng/Aorta vs. 3088 ng/Aorta). Bei der Fütterung mit Stanolestern war der Gehalt der Phytosterole deutlich geringer (Sitosterol 634 ng/Aorta und Campesterol 1849 ng/Aorta). Arteriosklerotische Läsionen konnten bei diesen gesunden Tieren allerdings nicht festgestellt werden.

Da bei Patienten mit Phytosterolämie, die meistens normale Cholesterolkonzentrationen im Plasma aufweisen, eine frühzeitige Arteriosklerose festgestellt werden konnte (Miettinen, 1980; Salen *et al.*, 1992), stellt sich schon seit längerem die Frage, ob Phytosterole auch bei Menschen ohne diese Erkrankung ein Risiko für die Entwicklung einer Arteriosklerose

darstellen. Bei Patienten mit einer positiven Familienanamnese einer koronaren Herzkrankheit fanden sich höhere Phytosterolkonzentrationen im Blut als bei Personen ohne eine positive Anamnese (Glueck *et al.*, 1991; Sudhop *et al.*, 2002a). Assmann *et al.* (2006) konnten zeigen, dass bei Männern ein erhöhtes Risiko für eine koronare Herzkrankheit mit einer erhöhten Sitosterolkonzentration im Plasma in Zusammenhang steht. Zudem wurden Phytosterole in atheromatösen Plaques bei Personen ohne besonders stark erhöhte Plasma-Phytosterolkonzentrationen gefunden (Mellies *et al.*, 1976). Auch bei den homozygoten Watanabe Kaninchen der vorliegenden Untersuchung könnten Phytosterole ein zusätzlicher Risikofaktor für die Entstehung einer Arteriosklerose sein. Die Fläche der Plaques in der Aorta und die Ratio von Intima zu Media waren unter der Zufuhr von Phytosterolen tendenziell größer als bei den Kontrolltieren (Tab. 3.9).

Wilund *et al.* (2004) konnten keinen Zusammenhang zwischen der Plasmakonzentration der Phytosterole und der Arteriosklerose bei ABCG5/G8 defizienten Mäusen und bei Mäusen, die unter einem LDL-Rezeptor Defekt leiden, nachweisen. Zudem untersuchten sie Probanden mit und ohne ein Risiko für eine koronare Herzkrankheit und konnten auch hier keinen Zusammenhang zwischen Plasma-Phytosterolkonzentration und dem Risiko einer Arteriosklerose erkennen. Dies konnte auch bei kürzlich durchgeführten Studien an Personen mit und ohne einer koronaren Herzkrankheit nachgewiesen werden (Fassbender *et al.*, 2006; Pinedo *et al.*, 2007).

Phytostanole tragen nach dem derzeitigen Wissensstand nicht zu der Entstehung einer Arteriosklerose bei. Ihre Plasmakonzentration sowie die Konzentration in der Intima der Aorta liegt deutlich unter der Konzentration der Phytosterole (Kritchevsky *et al.*, 2003). Zudem kann durch Phytostanole die Konzentration von Phytosterolen gesenkt werden. Bei Kaninchen konnte eine Fütterung mit Sitostanol die Plaquebildung in der Aorta deutlicher vermindern als eine Fütterung mit Sitosterol (Ikeda *et al.*, 1981). Bei einer zusätzlichen Fütterung der homozygoten Watanabe Kaninchen der vorliegenden Untersuchung mit Stanolestern war die Fläche der Plaques und die Ratio von Intima zu Media tendentiell kleiner als bei den Kontrolltieren (Tab. 3.9).

Die derzeitigen Erkenntnisse über das atherogene Potential von Phytosterolen sind widersprüchlich, und Langzeitstudien zu diesem Thema fehlen. In der vorliegenden Untersuchung konnte die Zufuhr von Phytosterolestern bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen, die zusätzlich mit Cholesterol gefüttert wurden, der Entstehung einer Arteriosklerose entgegenwirken. Bei den homozygoten WHHL-Kaninchen hingegen zeigte

sich bei einer erhöhten Zufuhr von Phytosterolestern eine tendenzielle Vergrößerung der Plaques in der Aorta. Man könnte jedoch annehmen, dass im gesunden Organismus der Nutzen aus der cholesterolsenkenden Wirkung der Phytosterole größer ist als der Schaden durch die Erhöhung der Konzentration der Phytosterole im Plasma. Der Einsatz von Phytostanolen im Bezug auf eine Prävention der Arteriosklerose kann anhand der vorliegenden Ergebnisse möglicherweise als sicherer angesehen werden als der Einsatz von Phytosterolen.

#### **4.3 Einfluss der Phytosterol- und Phytostanolfütterung auf den Cholesterolfstoffwechsel im Gehirn**

Lange Zeit galt die Annahme, dass Sterole und Stanole nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Mit der vorliegenden Studie konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass eine hochdosierte Zufuhr von Phytosterol- und Phytostanolestern, die mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen einhergehen, bei heterozygoten und homozygoten Watanabe Kaninchen mit einem Anstieg dieser Substanzen im Gehirn verbunden ist. Es konnte somit bewiesen werden, dass Phytosterole und -stanole in der Lage sind, über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn zu gelangen und dort zu akkumulieren. In Studien mit Mäusen und Menschen konnten keine oder lediglich sehr geringe Mengen von Campesterol und Sitosterol im Gehirn nachgewiesen werden (Lütjohann *et al.*, 2002; Heverin *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). Sogar im Gehirn von Patienten mit Phytosterolämie waren nur verhältnismäßig geringe Mengen dieser beiden Sterole zu finden (Campesterol 0.20 mg/g, Sitosterol 0.29 mg/g), während zwischen den Phytosterolkonzentrationen in anderen Geweben und dem Gehalt der Phytosterole im Plasma eine signifikante Korrelation zu verzeichnen war (Salen *et al.*, 1985a). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine 7 – 16-fache Erhöhung der Phytosterolkonzentration im Hirn von ABCG5/G8 k.o. Mäusen demonstriert (Jansen *et al.*, 2006). Möglicherweise sind die heutzutage sensitiveren Methoden zur Bestimmung von Phytosterolen und –stanolen für den Nachweis dieser Substanzen in niedrigen Konzentrationen verantwortlich.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine veröffentlichten Daten über das Vorkommen von Phytostanolen im Gehirn. Die vorliegende Studie ist somit der erste Beweis dafür, dass nicht nur Phytosterole sondern auch Phytostanole die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, bzw.

besteht auch hier die Möglichkeit, dass sie durch Umwandlung aus ihren ungesättigten Derivaten Campesterol und Sitosterol entstehen.

Es bleibt die Frage, wie die pflanzlichen Sterole und Stanole in das Gehirn gelangen. Jansen *et al.* (2006) zeigten eine signifikante Erhöhung der Phytosterole im Gehirn von ABCG5 und ABCG8 defizienten sowie bei Wild-Typ Mäusen. Bei Mäusen, die unter einem ApoE-Defekt leiden, zeigte sich diese Erhöhung jedoch nicht. WHHL-Kaninchen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden und bei denen Phytosterole und –stanole im Gehirn nachgewiesen werden konnten, haben 4 – 7-fach erhöhte Plasma-ApolipoproteinE-Konzentrationen (Rall *et al.*, 1988). Somit liegt die Vermutung nahe, dass ApoE an diesem Transport beteiligt ist. Da die Expression der ABCG5/G8-Transporter in der Region der Blut-Hirn Schranke der von Jansen *et al.* (2006) untersuchten Mäuse sehr gering war, ist es unwahrscheinlich, dass diese dort an dem Transport der Phytosterole und –stanole beteiligt waren (Jansen *et al.*, 2006).

Bemerkenswert war auch die Tatsache, dass, obwohl die Konzentration von Cholesterol und von pflanzlichen Sterolen und Stanolen im Plasma der homozygoten Watanabe Kaninchen um das 5 – 10-fache höher war als bei den heterozygoten Tieren (Tab. 3.5 und 3.11), die Konzentration dieser Substanzen im Gehirn beider Genotypen fast gleich war (Tab. 3.10 und 3.16). Dieser Befund weist auf eine limitierte Aufnahme dieser Substanzen im Gehirn hin.

Durch die Fütterung mit Stanolestern war im Gehirn, wie im Plasma, eine deutliche Verminderung der Sterolkonzentration zu erkennen. Zudem spielte auch hier die Dosis der Stanolzufuhr eine Rolle. Bei der höheren Dosis (3.4 %) war die Phytosterolkonzentration geringer als bei der Zufuhr von 1.7 % Stanolestern. Gab man den Tieren hingegen mit Sterolestern angereichertes Futter, so stieg neben der Phytosterolkonzentration auch die Phytostanolkonzentration im Gehirn an. Zudem war die Konzentration der pflanzlichen Sterole bei den Sterolestergruppen um ein Vielfaches höher als die Konzentration der Phytostanole bei den mit Stanolestern gefütterten Kaninchen. Anhand dieser Ergebnisse wäre eine Anreicherung von Lebensmitteln mit Stanolestern möglicherweise als sicherer anzusehen als eine Anreicherung mit Sterolestern, doch entsprechende Untersuchungen am Menschen gibt es nicht.

Wie auch schon in anderen Studien bewiesen (Sudhop *et al.*, 2002b), so war in der vorliegenden Untersuchung die intestinale Aufnahme von Campesterol höher als die von Sitosterol, angezeigt durch höhere Plasma-Campesterolkonzentrationen. Im Gehirn hingegen wiesen eine geringere Ratio von Campesterol zu Sitosterol und eine geringere Ratio von Campestanol zu Sitostanol im Vergleich zum Plasma darauf hin, dass Sitosterol und Sitostanol die Blut-Hirn-Schranke leichter überschreiten können als Campesterol und



Campestanol (Abb. 3.4 und 3.5). Entweder wurde mehr Sitosterol und Sitostanol in das Gehirn aufgenommen oder die Ausscheidung von Campesterol und Campestanol aus dem Gehirn war höher als die von Sitosterol und Sitostanol.

Das Gehirn ist das cholesterolreichste Organ des Körpers. Da die Blut-Hirn-Schranke eine Aufnahme von Cholesterol aus der Zirkulation verhindert, stammt das Cholesterol des Gehirns nicht aus der Peripherie sondern wird vom Gehirn selbst gebildet (Dietschy & Turley 2004). Störungen des Cholesterolstoffwechsels im Gehirn stehen in einem engen Zusammenhang mit der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen (Björkhem & Meaney 2004). Die Cholesterolsynthese des Gehirns wurde durch die Fütterung von Cholesterol sowie von pflanzlichen Sterol- und Stanolestern bei heterozygoten und homozygoten WHHL-Kaninchen nicht beeinflusst. Nur bei den heterozygoten Kaninchen konnte eine verminderte Cholesterolkonzentration bei den Tieren, welche Cholesterol in Kombination mit 3.4 % Sterol- oder 3.4 % Stanolestern bekamen, festgestellt werden. Welche Ursachen dieses Ergebnis hat, konnte nicht geklärt werden. Es sollte zudem nicht überbewertet werden, da bei den heterozygoten Tieren der zweiten Phase der Studie, die für 150 Tage mit Cholesterol und Sterol- oder Stanolestern gefüttert wurden, diese Veränderung nicht nachzuweisen war (Tab. A23). Hier war die Cholesterolkonzentration im Gehirn der Kaninchen, die zusätzlich Sterolester bekamen, sogar höher als bei den Kontrolltieren. Andersen *et al.* (1982) konnten nachweisen, dass eine Fütterung von weißen Neuseeland Kaninchen mit 0.2 % Cholesterol die Cholesterolsynthese in vielen extrahepatischen Geweben vermindert. Die Synthese im Gehirn blieb jedoch unverändert und auch die Cholesterolkonzentration des Gehirns änderte sich durch die Cholesterolfütterung nicht. Bei den ABCG5/G8 defizienten Mäusen in der Studie von Jansen *et al.* (2006), bei denen erhöhte Phytosterolkonzentrationen im Gehirn zu finden waren, änderte sich die Cholesterolsynthese im Gehirn ebenfalls nicht. Auch bei Patienten mit Phytosterolämie, welche stark erhöhte Phytosterolkonzentrationen im Plasma aufweisen, zeigte sich keine Veränderung der Cholesterolkonzentration im Gehirn im Vergleich zu Kontrollpersonen (Salen *et al.*, 1985a). Diese Datenlage bestätigt die strikte Regulation des Cholesterolstoffwechsels im Gehirn.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass erhöhte Phytosterol- und -stanolkonzentrationen im Plasma zu einer erhöhten Konzentration dieser Sterole und Stanole im Gehirn von Watanabe Kaninchen führen. Da die Phytosterolkonzentrationen im menschlichen Plasma jedoch deutlich geringer sind als bei den hier untersuchten Kaninchen

(Sudhop *et al.*, 2003), könnte der Gehalt der pflanzlichen Sterole und Stanole im Gehirn des Menschen ebenfalls um ein Vielfaches geringer sein. Wie sich die Zufuhr der hier verwendeten Phytosterol- und Phytostanolester auf das menschliche Gehirn auswirkt, bedarf demnach weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Phytosterole und –stanole in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und im Gehirn zu akkumulieren. Ihre Aufnahme in das Gehirn ist jedoch limitiert und die Konzentration der Stanole bei der Zufuhr von Stanolestern lag hier deutlich unter der Sterolkonzentration bei der Fütterung mit Sterolestern. Zudem wurde durch die Gabe von Stanolen die Konzentration der Sterole vermindert. Pflanzliche Sterole und Stanole zeigten im Gehirn der Kaninchen keinen Einfluss auf den Cholesterolsynthesemarker Lathosterol/Cholesterol. Um den Mechanismus, mit dem die Sterole und Stanole in das Gehirn transportiert werden, aufzuklären und um die Frage zu beantworten, ob Phytosterole/-stanole einen Einfluss auf die Gehirnfunktion haben, sind weitere Studien erforderlich.

## 5 Zusammenfassung

Es ist eindeutig bewiesen, dass die Hypercholesterolämie einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose und der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit ist. Die Anreicherung von Lebensmitteln mit Phytosterolen und Phytostanolen, die zu einer Verminderung der Resorption des Cholesterols im Darm und somit zu einer Senkung der Cholesterolkonzentration im Plasma führen, erfreut sich heutzutage zunehmender Beliebtheit. Neben dieser positiven Eigenschaft werden in letzter Zeit aber auch zunehmend Nebenwirkungen einer Zufuhr von Phytosterolen diskutiert. Beispielsweise leiden Patienten mit Phytosterolämie, die sehr hohe Phytosterolkonzentrationen im Plasma aufweisen, an einer frühzeitigen Arteriosklerose und an einer daraus resultierenden koronaren Herzkrankheit. Daher stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der Phytosterolkonzentration im Plasma die Entstehung der Arteriosklerose begünstigen kann. Zudem konnte kürzlich bewiesen werden, dass Phytosterole in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und somit in das Gehirn gelangen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Nutzen und die Risiken einer hochdosierten Zufuhr von Phytosterol- und Phytostanolestern zu überprüfen. Hierzu wurden heterozygote und homozygote Watanabe (WHHL-) Kaninchen entweder mit 1.7 % oder 3.4 % Phytostanolestern oder mit 3.4 % Phytosterolestern gefüttert. Die heterozygoten WHHL-Kaninchen erhielten zusätzlich noch 0.2 % Cholesterol mit dem Futter. Watanabe Kaninchen haben wie Patienten mit einer familiären Hypercholesterolämie, einen Defekt des LDL-Rezeptors und zeichnen sich demnach durch erhöhte Plasma-Cholesterolkonzentrationen aus. Zudem entwickeln sie arteriosklerotische Läsionen und Xanthome, wie sie auch beim Menschen frühzeitig beobachtet werden können. Mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie wurden die Cholesterol- und Lathosterolkonzentration (Cholesterol-Vorstufe) sowie die Konzentrationen der Phytosterole und Phytostanole in Plasma, Galle, Leber, Intima der Aorta und im Gehirn der Tiere bestimmt. Zudem wurde die Plaqueentwicklung in der Aorta der Kaninchen ausgewertet.

Bei den heterozygoten Watanabe Kaninchen konnten Phytosterole und -stanole bei einer gleichzeitigen Aufnahme von Cholesterol einen Anstieg der Plasma-Cholesterolkonzentration verhindern. Bei der Zufuhr von 3.4 % Phytostanolestern wurde das Plasmacholesterol im Vergleich zu den Kontrolltieren um 68 % gesenkt, durch die zusätzliche Aufnahme von Phytosterolestern um 64 % ( $p = 0.002$ ). 1.7 % Stanolester reichten für die Senkung des Plasma-Cholesterols nicht aus. Erhöhte Plasma-Cholesterolkonzentrationen, welche wie bei

den homozygoten Watanabe Kaninchen nicht auf eine alimentäre Zufuhr von Cholesterol zurückzuführen waren, wurden durch Phytosterole und Phytostanole nicht beeinflusst. Bei allen Kaninchen stieg die Phytosterolkonzentration im Plasma unter einer Zufuhr von Phytosterolestern und die Phytostanolkonzentration unter der Zufuhr von Phytostanolestern signifikant an. Die Plasmakonzentration der Phytostanole war hier aber um ein Vielfaches geringer als die Phytosterolkonzentration. Zudem konnte durch Phytostanole die Konzentration von Phytosterolen gesenkt werden.

Hinsichtlich der Arteriosklerose konnten Phytosterole und Phytostanole bei den heterozygoten WHHL-Kaninchen die Entstehung von arteriellen Plaques verhindern. Bei den Tieren, welche nur Cholesterol hinzugefüttert bekamen, entwickelten fünf von neun Kaninchen Plaques, unter einer zusätzlichen Aufnahme von 3.4 % Stanol- oder Sterolestern, konnte hingegen die Plaquebildung bei allen Tieren verhindert werden. Es gab einen engen Zusammenhang zwischen der Cholesterolkonzentration im Plasma und der Plaquefläche sowie zwischen der Cholesterolkonzentration in der Intima der Aorta und der Fläche der Plaques. Bei den homozygoten WHHL-Kaninchen hingegen, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Größe der Plaquefläche zwischen den Gruppen. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Phytosterole die Plaquebildung tendentiell erhöhen, während Phytostanole die Plaquefläche tendentiell verkleinern.

Die vorliegende Untersuchung war der erste Beweis dafür, dass nicht nur die Phytosterole sondern auch Phytostanole bei Watanabe Kaninchen die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Die Konzentration der Phytosterole war auch hier deutlich höher als die Phytostanolkonzentration. Die Aufnahme der Phytosterole und -stanole in das Hirn war jedoch limitiert. Die Cholesterolsynthese (Lathosterol/Cholesterol) im Gehirn wurde durch die Fütterung mit Phytosterol-/Phytostanolestern nicht beeinflusst. Überraschenderweise war jedoch die Cholesterolkonzentration im Gehirn der heterozygoten WHHL-Kaninchen, die mit 3.4 % Sterol- oder Stanolestern gefüttert wurden, geringer als bei den Kontrolltieren.

Aus den Ergebnissen dieser Studien lässt sich ableiten, dass Phytostanole bei dem Einsatz zur Senkung der Plasma-Cholesterolkonzentration bei Watanabe Kaninchen als sicherer und wirkungsvoller angesehen werden können als Phytosterole. Ihre Konzentration im Plasma steigt nicht so stark an wie die der Phytosterole und durch ihre Aufnahme kann neben der Reduzierung des Plasma-Cholesterols auch die Konzentration der Phytosterole gesenkt werden. Phytostanole senken das Risiko einer Arteriosklerose, während erhöhte Phytosterolkonzentrationen im Plasma möglicherweise einen zusätzlichen Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose darstellen. Im Gehirn der Kaninchen ist die Konzentration der

Phytostanole ebenfalls deutlich geringer als die Phytosterolkonzentration. Wie die Phytosterole und –stanole in das Gehirn gelangen und ob sie einen Einfluss auf die Gehirnfunktion haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aliev G, Castellani RJ, Petersen RB, Burnstock G, Perry G & Smith MA (2004) Pathobiology of familial hypercholesterolemic atherosclerosis. *J Submicrosc Cytol Pathol* **36**, 225-240.
- Andersen JM., Turley SD & Dietschy JM (1982) Relative rates of sterol synthesis in the liver and various extrahepatic tissues of normal and cholesterol-fed rabbits. Relationship to plasma lipoprotein and tissue cholesterol levels. *Biochim Biophys Acta* **711**, 421-30.
- Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F & Schulte H (2006) Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **16**, 13-21.
- Atkinson JB, Hoover RL, Berry KK & Swift LL (1989) Cholesterol-fed heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: a new model for atherosclerosis. *Atherosclerosis* **78**, 123-136.
- Ayesh R, Weststrate JA, Drewitt PN & Hepburn PA (1999) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 5. Faecal short-chain fatty acid and microflora content, faecal bacterial enzyme activity and serum female sex hormones in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterolester-enriched margarine. *Food Chem Toxicol* **37**, 1127-1138.
- Bajguz A & Tretyn A (2003) The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**, 1027-1046.
- Baker VA, Hepburn PA, Kennedy SJ, Jones PA, Lea LJ, Sumpter JP & Ashby J (1999) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. *Food Chem Toxicol* **37**, 13-22.
- Becker M, Staab D & von Bergmann K (1993) Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. *J Pediatr* **122**, 292-296.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R & Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**, 1771-1775.
- Bhattacharyya AK & Connor WE (1974) Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* **53**, 1033-1043.
- Bhattacharyya AK & Lopez LA (1979) Absorbability of plant sterols and their distribution in rabbit tissues. *Biochim Biophys Acta* **574**, 146-153.
- Biesalski HK & Grimm P (1999) Taschenatlas der Ernährung. *Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Björkhem I & Meaney S (2004) Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 806-815.
- Bloch K (1992) Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* **57**, 378-383.
- Boberg KM, Einarsson K & Björkhem I (1990) Apparent lack of conversion of sitosterol into C24-bile acids in humans. *J Lipid Res* **31**, 1083-1088.

- Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P & Innerarity TL (2001) The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100. *J Biol Chem* **276**, 9214-9218.
- Brown MS & Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47.
- Chapman MJ (1980) Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res* **21**, 789-853.
- Clubb FJ, Cerny JL, Deferrari DA, Butler-Aucoin MM, Willerson JT & Buja LM (2001) Development of atherosclerotic plaque with endothelial disruption in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit aortas. *Cardiovasc Pathol* **10**, 1-11.
- Czubayko F, Beumers B, Lammsfuss S, Lütjohann D & von Bergmann K (1991) A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. *J Lipid Res* **32**, 1861-1867.
- Daley SJ, Herderick EE, Cornhill JF & Rogers KA (1994) Cholesterol-fed and casein-fed rabbit models of atherosclerosis. Part 1: Differing lesion area and volume despite equal plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb* **14**, 95-104.
- Davis HR, Jr., Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP & Altmann SW (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* **279**, 33586-33592.
- De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T & Wood D (2003) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **10**, 1-10.
- Decker P, Brinkmann JF, Lindenthal B, Hirner A & von Bergmann K (1998) Evaluation of cholesterol absorption in rats using markers labeled with stable isotopes. Effects of complete bile diversion. *Hepatology* **45**, 2033-2037.
- Derfler K (2002) Familiäre Hypercholesterolämie. *J Kardiologie* **9**, 7-8.
- Dietschy JM, Kita T, Suckling KE, Goldstein JL & Brown MS (1983) Cholesterol synthesis in vivo and in vitro in the WHHL rabbit, an animal with defective low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res* **24**, 469-480.
- Dietschy JM & Turley SD (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* **45**, 1375-1397.
- Dowell FJ, Hamilton CA, Lindop GB & Reid JL (1995) Development and progression of atherosclerosis in aorta from heterozygous and homozygous WHHL rabbits. Effects of simvastatin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1152-1160.

- Fan J, Challah M, Shimoyamada H, Shiomi M, Marcovina S & Watanabe T (2000) Defects of the LDL receptor in WHHL transgenic rabbits lead to a marked accumulation of plasma lipoprotein[a]. *J Lipid Res* **41**, 1004-1012.
- Fan J & Watanabe T (2003) Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* **10**, 63-71.
- Fassbender K, Lütjohann D, Dik MG, Bremmer M, König J, Walter S, Liu Y, Letiembre M, von Bergmann K & Jonker C (2006) Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk-The LASA study. *Atherosclerosis*. In press.
- Fenton M (1992) Chromatographic separation of cholesterol in foods. *J Chromatogr* **624**, 369-388.
- Field FJ, Born E & Mathur SN (2004) Stanolesters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J Lipid Res* **45**, 2252-2259.
- Ginsberg HN (1998) Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* **27**, 503-519.
- Glass CK & Witztum JL (2001) Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* **104**, 503-516.
- Glueck CJ, Speirs J, Tracy T, Streicher P, Illig E & Vandegrift J (1991) Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives. *Metabolism* **40**, 842-848.
- Goldstein JL & Brown MS (2001) Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science* **292**, 1310-1312.
- Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H & Windler E (1993) Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* **34**, 1367-1383.
- Grundy SM & Mok HY (1977) Determination of cholesterol absorption in man by intestinal perfusion. *J Lipid Res* **18**, 263-271.
- Grundy SM & Denke MA (1990) Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* **31**, 1149-1172.
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Jr., Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Jr. & Stone NJ (2004) Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* **110**, 227-239.
- Gylling H & Miettinen TA (1994) Serum cholesterol and cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolaemic NIDDM patients before and during sitostanolester-margarine treatment. *Diabetologia* **37**, 773-780.
- Gylling H, Puska P, Vartiainen E & Miettinen TA (1999) Serum sterols during stanolester feeding in a mildly hypercholesterolemic population. *J Lipid Res* **40**, 593-600.



- Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Gylling H, Erkkilä AT & Uusitupa MI (2000a) Comparison of the effects of plant sterolester and plant stanolester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr* **54**, 715-725.
- Hallikainen MA, Sarkkinen ES & Uusitupa MI (2000b) Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men and women in a dose-dependent manner. *J Nutr* **130**, 767-776.
- Halling KK & Slotte JP (2004) Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim Biophys Acta* **1664**, 161-171.
- Hamada T, Goto H, Yamahira T, Sugawara T, Imaizumi K & Ikeda I (2006) Solubility in and affinity for the bile salt micelle of plant sterols are important determinants of their intestinal absorption in rats. *Lipids* **41**, 551-556.
- Harsch M, Gebhardt A, Reymann A, Lang G, Schliack M, Loser R, Braesen JH & Niendorf A (1998) Effects of pravastatin on cholesterol metabolism of cholesterol-fed heterozygous WHHL rabbits. *Br J Pharmacol* **124**, 277-282.
- Heinemann T, Kullak-Ublick GA, Pietruck B & von Bergmann K (1991) Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol* **40**, 59-63.
- Heinemann T, Axtmann G & von Bergmann K (1993) Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* **23**, 827-831.
- Hepburn PA, Horner SA & Smith M (1999) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 2. Subchronic 90-day oral toxicity study on phytosterolesters--a novel functional food. *Food Chem Toxicol* **37**, 521-532.
- Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, Diczfalussy U, Winblad B & Björkhem I (2004) Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* **45**, 186-193.
- Homan R & Hamelshle KL (1998) Phospholipase A2 relieves phosphatidylcholine inhibition of micellar cholesterol absorption and transport by human intestinal cell line Caco-2. *J Lipid Res* **39**, 1197-1209.
- Hübschmann HJ (1996) Handbuch der GC/MS. Grundlagen und Anwendung. Weinheim, Wiley-VCH.
- Igel M, Giesa U, Lütjohann D & von Bergmann K (2003) Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* **44**, 533-538.
- Ikeda I & Sugano M (1978) Comparison of absorption and metabolism of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. *Atherosclerosis* **30**, 227-237.
- Ikeda I, Kawasaki A, Samezima K & Sugano M (1981) Antihypercholesterolemic activity of beta-sitostanol in rabbits. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **27**, 243-251.
- Ikeda I, Tanabe Y & Sugano M (1989) Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **35**, 361-369.

- Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL & Grundy SM (1987) Familial defective apolipoprotein B-100: Low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci* **84**, 6919-6923.
- Jansen PJ, Lütjohann D, Abildayeva K, Vanmierlo T, Plösch T, Plat J, von Bergmann K, Groen AK, Ramaekers FC, Kuipers F & Mulder M (2006) Dietary plant sterols accumulate in the brain. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 445-453.
- Jones PJ, MacDougall DE, Ntanios F & Vanstone CA (1997) Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol* **75**, 217-227.
- Jones PJ, Raeini-Sarjaz M, Ntanios FY, Vanstone CA, Feng JY & Parsons WE (2000) Modulation of plasma lipid levels and cholesterol kinetics by phytosterol versus phytostanolesters. *J Lipid Res* **41**, 697-705.
- Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I & Makishima M (2003) Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* **278**, 36091-36098.
- Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T & Paoletti R (2003) Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* **78**, 965-978.
- Kita T, Brown MS, Watanabe Y & Goldstein JL (1981) Deficiency of low density lipoprotein receptors in liver and adrenal gland of the WHHL rabbit, an animal model of familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 2268-2272.
- Kolodgie FD, Katocs AS, Jr., Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ & Virmani R (1996) Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1454-1464.
- Kritchevsky D (1997) Phytosterols. *Adv Exp Med Biol* **427**, 235-243.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Czarnecki SK, Wolfe B & Setchell KD (2003) Serum and aortic levels of phytosterols in rabbits fed sitosterol or sitostanolester preparations. *Lipids* **38**, 1115-1118.
- Kromidas S (1999) Validierung in der Analytik. Die Praxis der instrumentellen Analytik. Weinheim, Wiley-VCH.
- Kroon AA, Stalenhoef AF, Buikema H, Demacker PN, de Wilde PC, Leijten PA & van Gilst WH (1993) The effect of cholesterol reduction on the endothelial function and progression of atherosclerosis in WHHL rabbits. *Atherosclerosis* **103**, 221-230.
- Law M (2000) Plant sterol and stanol margarines and health. *Bmj* **320**, 861-864.
- Law MR, Wald NJ & Thompson SG (1994) By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *Bmj* **308**, 367-372.
- Lea LJ, Hepburn PA, Wolfreys AM & Baldrick P (2004) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food Chem Toxicol* **42**, 771-783.

- Lea LJ & Hepburn PA (2006) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 9: Results of a European post-launch monitoring programme. *Food Chem Toxicol* **44**, 1213-1222.
- 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 (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* **27**, 79-83.
- Lees AM, Mok HY, Lees RS, McCluskey MA & Grundy SM (1977) Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* **28**, 325-38.
- Lewis GF & Rader DJ (2005) New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* **96**, 1221-1232.
- Lucas AD & Greaves DR (2001) Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1-18.
- Lütjohann D, Björkhem I, Beil UF & von Bergmann K (1995) Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* **36**, 1763-1773.
- Lütjohann D, Björkhem I & Ose L (1996) Phytosterolaemia in a Norwegian family: diagnosis and characterization of the first Scandinavian case. *Scand J Clin Lab Invest* **56**, 229-240.
- Lütjohann D, Brzezinka A, Barth E, Abramowski D, Staufenbiel M, von Bergmann K, Beyreuther K, Multhaup G & Bayer TA (2002) Profile of cholesterol-related sterols in aged amyloid precursor protein transgenic mouse brain. *J Lipid Res* **43**, 1078-1085.
- Marais AD & Firth JC (2005) The diagnosis and management of familial hypercholesterolaemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **9**, 141-149.
- Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH & Wentworth D (1986) Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* **2**, 933-936.
- Mattson FH, Grundy SM & Crouse JR (1982) Optimizing the effect of plant sterols on cholesterol absorption in man. *Am J Clin Nutr* **35**, 697-700.
- Mellies MJ, Ishikawa TT, Glueck CJ, Bove K & Morrison J (1976) Phytosterols in aortic tissue in adults and infants. *J Lab Clin Med* **88**, 914-921.
- Mel'nikov SM, Seijen ten Hoorn JW & Eijkelenboom AP (2004) Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an in vitro study. *Chem Phys Lipids* **127**, 121-141.
- Mensink RP, Ebbing S, Lindhout M, Plat J & van Heugten MM (2002) Effects of plant stanolesters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. *Atherosclerosis* **160**, 205-213.
- Miettinen TA (1980) Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* **10**, 27-35.

- Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H & Vartiainen E (1995) Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N Engl J Med* **333**, 1308-1312.
- Moghadasian MH, McManus BM, Pritchard PH & Fröhlich JJ (1997) "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 119-126.
- Moghadasian MH, Godin DV, McManus BM & Fröhlich JJ (1999a) Lack of regression of atherosclerotic lesions in phytosterol-treated apo E-deficient mice. *Life Sci* **64**, 1029-1036.
- Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B & Fröhlich JJ (1999b) Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation* **99**, 1733-1739.
- Mok HY, von Bergmann K & Grundy SM (1979) Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J Lipid Res* **20**, 389-398.
- Moreau RA & Hicks KB (2004) The in vitro hydrolysis of phytosterol conjugates in food matrices by mammalian digestive enzymes. *Lipids* **39**, 769 - 776.
- Mortensen A, Breinholt V, Dalsgaard T, Frandsen H, Lauridsen ST, Laigaard J, Ottesen B & Larsen JJ (2001) 17beta-Estradiol but not the phytoestrogen naringenin attenuates aortic cholesterol accumulation in WHHL rabbits. *J Lipid Res* **42**, 834-843.
- Nagashima M, McLean JW & Lawn RM (1988) Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* **29**, 1643-1649.
- Nashed B, Yeganeh B, HayGlass KT & Moghadasian MH (2005) Antiatherogenic effects of dietary plant sterols are associated with inhibition of proinflammatory cytokine production in Apo E-KO mice. *J Nutr* **135**, 2438-2444.
- NCEP (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143-3421.
- Nestel P, Cehun M, Pomeroy S, Abbey M & Weldon G (2001) Cholesterol-lowering effects of plant sterolesters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods. *Eur J Clin Nutr* **55**, 1084-1090.
- Nguyen LB, Salen G, Shefer S, Tint GS, Shore V & Ness GC (1990) Decreased cholesterol biosynthesis in sitosterolemia with xanthomatosis: diminished mononuclear leukocyte 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and enzyme protein associated with increased low-density lipoprotein receptor function. *Metabolism* **39**, 436-443.
- Nguyen TT (1999) The cholesterol-lowering action of plant stanolesters. *J Nutr* **129**, 2109-2112.
- Ntanios FY, Jones PJ & Fröhlich JJ (1998) Dietary sitostanol reduces plaque formation but not lecithin cholesterol acyl transferase activity in rabbits. *Atherosclerosis* **138**, 101-110.
- O'Neill FH, Sanders TA & Thompson GR (2005) Comparison of efficacy of plant Stanolester and Sterolester: short-term and longer-term studies. *Am J Cardiol* **96**, 29-36.

- Ostlund RE, Jr., McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF & Spilburg CA (2002) Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytosterols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, 911-916.
- Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, Goldstein LB, Greenland P, Grundy SM, Hong Y, Miller NH, Lauer RM, Ockene IS, Sacco RL, Sallis JF, Jr., Smith SC, Jr., Stone NJ & Taubert KA (2002) AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation* **106**, 388-391.
- Peterson DW (1951) Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* **78**, 143-147.
- Phelan JP, Van Lenten BJ, Fogelman AF, Kean C, Haberland ME & Edwards PA (1985) Notes on the breeding of the WHHL rabbit: an animal model of familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* **26**, 776-778.
- Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J & Lampi AM (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* **80**, 939-966.
- Pinedo S, Vissers MN, von Bergmann K, Elharchaoui K, Lütjohann D, Luben R, Wareham NJ, Kastelein JJ, Khaw KT & Boekholdt SM (2007) Plasma levels of plant sterols and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women; the prospective EPIC-Norfolk population study. *J Lipid Res* **48**, 139-144.
- Plat J & Mensink RP (2002) Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *Faseb J* **16**, 1248-1253.
- Plat J & Mensink RP (2005) Plant stanol and sterolesters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol* **96**, 15-22.
- Plat J, Beugels I, Gijbels MJ, de Winther MP & Mensink RP (2006) Plant sterol or stanolesters retard lesion formation in LDL receptor-deficient mice independent of changes in serum plant sterols. *J Lipid Res* **47**, 2762-2771.
- Plösch T, Kruit JK, Bloks VW, Huijkman NC, Havinga R, Duchateau GS, Lin Y & Kuipers F (2006) Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the abcg5/8 transporter. *J Nutr* **136**, 2135-2140.
- Pollak OJ (1953) Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* **7**, 702-706.
- Prange W (2001) Entwicklung einer gaschromatographischen/ massenspektrometrischen Methode zur Analyse von Sterolen und Stanolen im menschlichen Serum und ihre Anwendung in klinischen Studien. PhD-Thesis, Bonn. [https://www.kirke.hbz-nrw.de/dcb/Alle\\_061/Buecher\\_18/in\\_NRW\\_05/013241149.html](https://www.kirke.hbz-nrw.de/dcb/Alle_061/Buecher_18/in_NRW_05/013241149.html)
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Caira F, Stock SR & Spelsberg TC (2005) Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced calcification in the aortic valves via the Lrp5 receptor pathway. *Circulation* **112**, 229-234.

- Rall CJ, Hoeg JM, Gregg RE, Law SW, Monge JC, Meng MS, Zech LA & Brewer HB, Jr. (1988) Enhanced apolipoprotein E production with normal hepatic mRNA levels in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Arteriosclerosis* **8**, 804-809.
- Ratnayake WM, L'Abbe MR, Mueller R, Hayward S, Plouffe L, Hollywood R & Trick K (2000) Vegetable oils high in phytosterols make erythrocytes less deformable and shorten the life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* **130**, 1166-78.
- Rehner G & Daniel H (2002) Biochemie der Ernährung. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg.
- Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809.
- Rücker G, Neugebauer M & Willems GG (1992) Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysemethoden. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart.
- Salen G, Horak I, Rothkopf M, Cohen JL, Speck J, Tint GS, Shore V, Dayal B, Chen T & Shefer S (1985a) Lethal atherosclerosis associated with abnormal plasma and tissue sterol composition in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res* **26**, 1126-1133.
- Salen G, Kwiterovich PO, Jr., Shefer S, Tint GS, Horak I, Shore V, Dayal B & Horak E (1985b) Increased plasma cholesterol and 5 alpha-saturated plant sterol derivatives in subjects with sitosterolemia and xanthomatosis. *J Lipid Res* **26**, 203-209.
- Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS & Shore V (1992) Sitosterolemia. *J Lipid Res* **33**, 945-955.
- Salen G, von Bergmann K, Lütjohann D, Kwiterovich P, Kane J, Patel SB, Musliner T, Stein P & Musser B (2004) Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation* **109**, 966-971.
- Sanders DJ, Minter HJ, Howes D & Hepburn PA (2000) The safety evaluation of phytosterolesters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat. *Food Chem Toxicol* **38**, 485-491.
- Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM & Turley SD (1998) Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7alpha-hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res* **39**, 1833-43.
- SCF (2003) Opinion of the Scientific Committee on Food on an application from ADM for approval of plant sterol-enriched foods.  
[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html)
- Shiomi M, Ito T, Watanabe Y, Tsujita Y, Kuroda M, Arai M, Fukami M, Fukushige J & Tamura A (1990) Suppression of established atherosclerosis and xanthomas in mature WHHL rabbits by keeping their serum cholesterol levels extremely low. Effect of pravastatin sodium in combination with cholestyramine. *Atherosclerosis* **83**, 69-80.
- Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S & Fan J (2003) Development of an animal model for spontaneous myocardial infarction (WHHLMI rabbit). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1239-1244.

- Shukla A, Sharma MK, Jain A & Goel PK (2005) Prevention of atherosclerosis progression using atorvastatin in normolipidemic coronary artery disease patients-a controlled randomized trial. *Indian Heart J* **57**, 675-680.
- Shulman RS, Bhattacharyya AK, Connor WE & Fredrickson DS (1976) Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. *N Engl J Med* **294**, 482-483.
- Slesinski RS, Turnbull D, Frankos VH, Wolterbeek AP & Waalkens-Berendsen DH (1999) Developmental toxicity study of vegetable oil-derived stanol fatty acid esters. *Regul Toxicol Pharmacol* **29**, 227-233.
- Stalenhoef AF, Hectors M & Demacker PN (2001) Effect of plant sterol-enriched margarine on plasma lipids and sterols in subjects heterozygous for phytosterolaemia. *J Intern Med* **249**, 163-166.
- Stamler J, Wentworth D & Neaton JD (1986) Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Jama* **256**, 2823-2828.
- Statistisches Bundesamt (2005) [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
- Stryer L (1996) Biochemie, 4. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg.
- Sudhop T & von Bergmann K (2002) Cholesterol absorption inhibitors for the treatment of hypercholesterolaemia. *Drugs* **62**, 2333-2347.
- Sudhop T, Gottwald BM & von Bergmann K (2002a) Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* **51**, 1519-1521.
- Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Luers C, Berthold HK & von Bergmann K (2002b) Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut* **51**, 860-863.
- Sudhop T, Lütjohann D, Agna M, von Ameln C, Prange W & von Bergmann K (2003) Comparison of the effects of sitostanol, sitostanol acetate, and sitostanol oleate on the inhibition of cholesterol absorption in normolipemic healthy male volunteers. A placebo controlled randomized cross-over study. *Arzneimittelforschung* **53**, 708-713.
- Sudhop T, Lütjohann D & von Bergmann K (2005) Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Ther* **105**, 333-341.
- Sugano M, Morioka H & Ikeda I (1977) A comparison of hypocholesterolemic activity of beta-sitosterol and beta-sitostanol in rats. *J Nutr* **107**, 2011-2019.
- Sun H, Usui S, Shiomi M, Watanabe T & Fan J (2002) A rapid PCR method of genotyping LDL receptor mutations in WHHL rabbits. *J Atheroscler Thromb* **9**, 145-148.
- Tall AR (1993) Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* **34**, 1255-1274.
- Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Arai M & Watanabe H (1980) WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS Lett* **118**, 81-84.

- Thelen KM, Lütjohann D, Vesalainen R, Janatuinen T, Knuuti J, von Bergmann K, Lehtimäki T & Laaksonen R (2006a) Effect of pravastatin on plasma sterols and oxysterols in men. *Eur J Clin Pharmacol* **62**, 9-14.
- Thelen KM, Rentsch KM, Gutteck U, Heverin M, Olin M, Andersson U, von Eckardstein A, Björkhem I & Lütjohann D (2006b) Brain cholesterol synthesis in mice is affected by high dose of simvastatin but not of pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 1146-1152.
- Thuluva SC, Igel M, Giesa U, Lütjohann D, Sudhop T & von Bergmann K (2005) Ratio of lathosterol to campesterol in serum predicts the cholesterol-lowering effect of sitostanol-supplemented margarine. *Int J Clin Pharmacol Ther* **43**, 305-310.
- Tilvis RS & Miettinen TA (1986) Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* **43**, 92-97.
- Vanhanen HT, Blomqvist S, Ehnholm C, Hyvonen M, Jauhiainen M, Torstila I & Miettinen TA (1993) Serum cholesterol, cholesterol precursors, and plant sterols in hypercholesterolemic subjects with different apoE phenotypes during dietary sitostanolester treatment. *J Lipid Res* **34**, 1535-1544.
- Vanhanen HT, Kajander J, Lehtovirta H & Miettinen TA (1994) Serum levels, absorption efficiency, faecal elimination and synthesis of cholesterol during increasing doses of dietary sitostanolesters in hypercholesterolaemic subjects. *Clin Sci (Lond)* **87**, 61-67.
- Verschuren WM, Jacobs DR, Bloemberg BP, Kromhout D, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F et al. (1995) Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *Jama* **274**, 131-136.
- Volger OL, Mensink RP, Plat J, Hornstra G, Havekes LM & Princen HM (2001) Dietary vegetable oil and wood derived plant stanolesters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE\*3-Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* **157**, 375-381.
- von Bergmann K, Sudhop T & Lütjohann D (2005) Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol* **96**, 10-14.
- Voshol PJ, Havinga R, Wolters H, Ottenhoff R, Princen HM, Oude Elferink RP, Groen AK & Kuipers F (1998) Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice. *Gastroenterology* **114**, 1024-1034.
- Waalkens-Berendsen DH, Wolterbeek AP, Wijnands MV, Richold M & Hepburn PA (1999) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 3. Two-generation reproduction study in rats with phytosterolesters--a novel functional food. *Food Chem Toxicol* **37**, 683-696.
- Wang C, Lin HJ, Chan TK, Salen G, Chan WC & Tse TF (1981) A unique patient with coexisting cerebrotendinous xanthomatosis and beta-sitosterolemia. *Am J Med* **71**, 313-319.
- Watanabe Y (1980) Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* **36**, 261-268.
- Wester I (2000) Cholesterol lowering effect of plant sterols. *Eur J Lipid Sci Technol*; 37-44.



- Weststrate JA & Meijer GW (1998) Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* **52**, 334-343.
- Weststrate JA, Ayesh R, Bauer-Plank C & Drewitt PN (1999) Safety evaluation of phytoSterolesters. Part 4. Faecal concentrations of bile acids and neutral sterols in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytoSterolester-enriched margarine. *Food Chem Toxicol* **37**, 1063-1071.
- Whitfield AJ, Barrett PH, van Bockxmeer FM & Burnett JR (2004) Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem* **50**, 1725-1732.
- Wilson RB, Miller RA, Middleton CC & Kinden D (1982) Atherosclerosis in rabbits fed a low cholesterol diet for five years. *Arteriosclerosis* **2**, 228-241.
- Wilund KR, Yu L, Xu F, Vega GL, Grundy SM, Cohen JC & Hobbs HH (2004) No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 2326-32.
- Wolfreys AM & Hepburn PA (2002) Safety evaluation of phytosterolesters. Part 7. Assessment of mutagenic activity of phytosterols, phytosterolesters and the cholesterol derivative, 4-cholesten-3-one. *Food Chem Toxicol* **40**, 461-470.
- Xu G, Salen G, Shefer S, Ness GC, Nguyen LB, Parker TS, Chen TS, Zhao Z, Donnelly TM & Tint GS (1995) Unexpected inhibition of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholesterol in New Zealand white and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Clin Invest* **95**, 1497-1504.
- Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, von Bergmann K, Lütjohann D, Cohen JC & Hobbs HH (2002a) Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16237-16242.
- Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC & Hobbs HH (2002b) Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* **110**, 671-680.
- Yu L, von Bergmann K, Lütjohann D, Hobbs HH & Cohen JC (2004) Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res* **45**, 301-307.

Tabelle A1. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD)

Sterol/ Stanol	Kontrolle		0.1 % Cholesterol		0.2 % Cholesterol	
	Tag 1	Tag 28	Tag 1	Tag 28	Tag 1	Tag 28
Cholesterol (mg/dl)	131 ± 45.6	75.3 ± 23.6 <sup>a</sup>	97.0 ± 20.2	204 ± 89.3 <sup>a,e</sup>	135 ± 23.0	767 ± 320 <sup>b,f</sup>
Lathosterol (mg/dl)	0.250 ± 0.13	0.058 ± 0.018 <sup>b</sup>	0.150 ± 0.06	0.078 ± 0.055 <sup>a</sup>	0.210 ± 0.07	0.484 ± 0.260 <sup>a,e</sup>
Campesterol (mg/dl)	2.07 ± 0.38	1.17 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.55 ± 0.53	2.36 ± 0.94 <sup>e</sup>	2.32 ± 0.72	5.25 ± 2.49 <sup>a,e</sup>
Sitosterol (mg/dl)	1.00 ± 0.17	0.43 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.85 ± 0.22	0.66 ± 0.24 <sup>d</sup>	1.20 ± 0.41	1.23 ± 0.44 <sup>e</sup>
Campestanol (µg/dl)	61.1 ± 15.3	50.5 ± 18.2	46.5 ± 11.0	122 ± 80.8 <sup>a,d</sup>	57.2 ± 18.1	238 ± 111 <sup>b,e</sup>
Sitostanol (µg/dl)	29.4 ± 6.53	19.0 ± 7.10 <sup>b</sup>	23.2 ± 6.10	30.0 ± 16.4	31.1 ± 7.40	63.5 ± 24.5 <sup>b,e</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	2.08 ± 1.12	0.79 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.56	0.35 ± 0.08 <sup>c,f</sup>	1.52 ± 0.43	0.61 ± 0.11 <sup>c,d</sup>
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	16.7 ± 3.14	15.8 ± 2.11	15.7 ± 2.90	11.7 ± 1.35 <sup>b,f</sup>	17.0 ± 3.75	6.75 ± 0.87 <sup>c,f</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	8.25 ± 2.55	5.97 ± 1.66 <sup>a</sup>	8.70 ± 1.22	3.30 ± 0.49 <sup>c,e</sup>	8.84 ± 2.39	1.69 ± 0.40 <sup>c,f</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.51 ± 0.19	0.68 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.11	0.57 ± 0.11	0.42 ± 0.10	0.31 ± 0.06 <sup>a,f</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.24 ± 0.07	0.25 ± 0.06	0.25 ± 0.07	0.14 ± 0.03 <sup>b,e</sup>	0.23 ± 0.05	0.08 ± 0.01 <sup>c,f</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 28; <sup>d</sup> p ≤ 0.05, <sup>e</sup> p ≤ 0.01, <sup>f</sup> p ≤ 0.001 vs. Tag 28 der Kontrolle

Tabelle A2. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei homozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD)

Sterol/ Stanol	Kontrolle		0.1 % Cholesterol		0.2 % Cholesterol	
	Tag 1	Tag 28	Tag 1	Tag 28	Tag 1	Tag 28
Cholesterol (mg/dl)	849 ± 176	964 ± 97.6	723 ± 204	1421 ± 311 <sup>a,d</sup>	1006 ± 107	2212 ± 285 <sup>c,f</sup>
Lathosterol (mg/dl)	1.40 ± 0.76	0.72 ± 0.43 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.32	1.22 ± 0.25	1.43 ± 0.15	1.55 ± 0.25 <sup>e</sup>
Campesterol (mg/dl)	12.7 ± 3.36	14.4 ± 1.07	10.3 ± 3.36	16.5 ± 3.23	13.5 ± 2.17	20.8 ± 4.05 <sup>b,e</sup>
Sitosterol (mg/dl)	6.17 ± 1.85	4.94 ± 0.71	5.69 ± 1.45	4.56 ± 0.89	6.39 ± 0.82	4.93 ± 0.70 <sup>b</sup>
Campestanol (µg/dl)	339 ± 153	589 ± 343	276 ± 58.7	949 ± 224 <sup>b</sup>	352 ± 61.7	888 ± 136 <sup>c</sup>
Sitostanol (µg/dl)	203 ± 110	249 ± 160	162 ± 62.5	222 ± 48.4	201 ± 37.7	184 ± 22.0
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	1.59 ± 0.64	0.75 ± 0.44 <sup>b</sup>	2.19 ± 0.43	0.87 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.17	0.71 ± 0.16 <sup>c</sup>
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	14.9 ± 2.16	15.0 ± 0.93	14.4 ± 3.36	11.7 ± 1.24 <sup>e</sup>	13.3 ± 1.30	9.36 ± 1.25 <sup>b,f</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	7.16 ± 1.09	5.19 ± 1.12 <sup>a</sup>	8.23 ± 2.32	3.25 ± 0.52 <sup>b,e</sup>	6.37 ± 0.79	2.25 ± 0.34 <sup>c,f</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.39 ± 0.11	0.63 ± 0.43	0.40 ± 0.10	0.67 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.35 ± 0.04	0.40 ± 0.07
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.23 ± 0.08	0.27 ± 0.20	0.24 ± 0.11	0.16 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.08 ± 0.02 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 28; <sup>d</sup> p ≤ 0.05, <sup>e</sup> p ≤ 0.01, <sup>f</sup> p ≤ 0.001 vs. Tag 28 der Kontrolle

Tabelle A3. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Cholesterol (µg/mg)	6.00 ± 0.80	6.83 ± 2.37	13.3 ± 3.36 <sup>c</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.130 ± 0.008	0.007 ± 0.004	0.012 ± 0.004
Campesterol (µg/mg)	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.12 ± 0.04
Sitosterol (µg/mg)	0.039 ± 0.008	0.029 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.028 ± 0.012
Campestanol (ng/mg)	4.01 ± 0.85	5.82 ± 2.49	5.81 ± 2.16
Sitostanol (ng/mg)	1.49 ± 0.37	1.51 ± 0.39	1.54 ± 0.57
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.13 ± 1.30	1.23 ± 1.08	0.91 ± 0.18 <sup>a</sup>
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	19.3 ± 2.92	15.2 ± 2.47 <sup>a</sup>	8.76 ± 1.59 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	6.60 ± 1.38	4.47 ± 1.04 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.47 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.67 ± 0.14	0.85 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.09 <sup>b</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.05	0.11 ± 0.02 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. Kontrolle

Tabelle A4. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Cholesterol (µg/mg)	6.41 ± 0.90	7.94 ± 1.67	15.4 ± 4.52 <sup>b</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.016 ± 0.009	0.010 ± 0.003	0.014 ± 0.005
Campesterol (µg/mg)	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.08
Sitosterol (µg/mg)	0.049 ± 0.014	0.035 ± 0.006	0.039 ± 0.011
Campestanol (ng/mg)	5.28 ± 2.04	6.47 ± 0.95	6.89 ± 2.21
Sitostanol (ng/mg)	1.87 ± 0.76	1.88 ± 0.18	1.68 ± 0.40
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.60 ± 1.82	1.39 ± 0.64	0.90 ± 0.17
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	20.8 ± 3.39	15.9 ± 1.54 <sup>a</sup>	11.5 ± 2.00 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	7.58 ± 1.59	4.55 ± 0.86 <sup>b</sup>	2.55 ± 0.49 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.82 ± 0.31	0.83 ± 0.13	0.45 ± 0.04
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.29 ± 0.12	0.24 ± 0.05	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. Kontrolle

Tabelle A5. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futterm (n = 7, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	6.48 ± 7.79	2.57 ± 1.99	1.18 ± 0.40
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	71.0 ± 18.6	51.4 ± 7.31 <sup>a</sup>	43.4 ± 12.9 <sup>b</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	67.0 ± 52.5	32.0 ± 9.24	23.0 ± 8.33 <sup>a</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	21.8 ± 11.9	19.4 ± 4.81	12.2 ± 5.71
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	10.2 ± 6.59	6.68 ± 1.62	3.87 ± 1.89 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01 vs. Kontrolle

Tabelle A6. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.99 ± 4.45	2.32 ± 0.93	1.57 ± 0.82
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	63.6 ± 5.81	50.9 ± 10.5 <sup>a</sup>	48.9 ± 6.07 <sup>b</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	47.7 ± 11.3	30.9 ± 10.1 <sup>a</sup>	26.6 ± 2.94 <sup>b</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	16.6 ± 5.91	18.0 ± 4.95	11.3 ± 1.22
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	8.49 ± 4.39	6.69 ± 2.10	3.50 ± 0.38

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01 vs. Kontrolle

Tabelle A7. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 7, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Cholesterol (µg/mg)	5.86 ± 1.46	5.60 ± 0.39	12.0 ± 4.91 <sup>a</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.010 ± 0.006	0.009 ± 0.004	0.009 ± 0.004
Campesterol (µg/mg)	0.074 ± 0.017	0.069 ± 0.015	0.094 ± 0.044
Sitosterol (µg/mg)	0.027 ± 0.011	0.024 ± 0.005	0.026 ± 0.008
Campestanol (ng/mg)	4.32 ± 1.85	4.38 ± 0.75	6.35 ± 2.22
Sitostanol (ng/mg)	2.11 ± 2.05	1.67 ± 0.48	2.07 ± 0.63
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	1.69 ± 0.70	1.05 ± 0.25	0.69 ± 0.13 <sup>b</sup>
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	12.8 ± 1.86	12.4 ± 1.90	7.86 ± 1.48 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.88 ± 0.63	4.32 ± 0.36	2.05 ± 0.46 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.72 ± 0.15	0.78 ± 0.09	0.55 ± 0.08 <sup>a</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.32 ± 0.20	0.30 ± 0.07	0.18 ± 0.04

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. Kontrolle



Tabelle A8. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Cholesterol (µg/mg)	21.5 ± 9.86	25.5 ± 2.18	51.4 ± 22.5 <sup>a</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.018 ± 0.008	0.020 ± 0.000	0.032 ± 0.008 <sup>a</sup>
Campesterol (µg/mg)	0.32 ± 0.14	0.32 ± 0.04	0.53 ± 0.25
Sitosterol (µg/mg)	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.08
Campestanol (ng/mg)	12.9 ± 4.66	17.2 ± 3.25	22.0 ± 7.59
Sitostanol (ng/mg)	4.73 ± 1.60	4.95 ± 1.02	5.64 ± 1.73
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.80 ± 0.26	0.75 ± 0.13	0.67 ± 0.19
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	15.1 ± 0.90	12.7 ± 1.22 <sup>b</sup>	10.2 ± 1.12 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.78 ± 0.52	3.37 ± 0.57 <sup>b</sup>	2.66 ± 0.45 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.67 ± 0.37	0.67 ± 0.12	0.45 ± 0.10
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.25 ± 0.13	0.19 ± 0.03	0.12 ± 0.04

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. Kontrolle

Tabelle A9. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futterm (n = 7, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Cholesterol (µg/mg)	48.7 ± 7.94	50.1 ± 15.5	50.6 ± 11.8
Lathosterol (µg/mg)	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.03
Campesterol (µg/mg)	0.033 ± 0.007	0.037 ± 0.013	0.032 ± 0.008
Sitosterol (µg/mg)	0.033 ± 0.008	0.037 ± 0.015	0.034 ± 0.006
Campestanol (ng/mg)	2.16 ± 0.48	2.61 ± 0.98	2.39 ± 0.44
Sitostanol (ng/mg)	3.90 ± 1.11	4.29 ± 1.68	3.50 ± 0.62
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.86 ± 0.36	2.70 ± 0.28	2.40 ± 0.25 <sup>a</sup>
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.67 ± 0.09	0.72 ± 0.09	0.63 ± 0.06
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.69 ± 0.13	0.73 ± 0.19	0.68 ± 0.08
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.045 ± 0.007	0.053 ± 0.014	0.048 ± 0.006
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.003 ± 0.0004	0.003 ± 0.0003	0.002 ± 0.0003

<sup>a</sup> p ≤ 0.05 vs. Kontrolle

Tabelle A10. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 28-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 5, MW ± SD)

<b>Sterol/ Stanol</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>
Cholesterol (µg/mg)	41.8 ± 8.00	63.7 ± 9.13 <sup>b</sup>	40.7 ± 9.45
Lathosterol (µg/mg)	0.11 ± 0.02	0.16 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.03
Campesterol (µg/mg)	0.030 ± 0.007	0.040 ± 0.014	0.027 ± 0.005
Sitosterol (µg/mg)	0.038 ± 0.011	0.050 ± 0.028	0.033 ± 0.011
Campestanol (ng/mg)	2.62 ± 0.93	3.39 ± 2.15	2.40 ± 0.75
Sitostanol (ng/mg)	3.76 ± 1.08	5.12 ± 1.94	2.80 ± 0.64
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.69 ± 0.30	2.57 ± 0.39	2.47 ± 0.20
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.72 ± 0.07	0.61 ± 0.13	0.67 ± 0.06
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.90 ± 0.15	0.75 ± 0.29	0.80 ± 0.10
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.062 ± 0.014	0.051 ± 0.023	0.058 ± 0.006
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.090 ± 0.016	0.079 ± 0.022	0.069 ± 0.007 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01 vs. Kontrolle

Tabelle A11. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1% Cholesterol</b>	<b>0.1% Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	11.8 ± 0.93	9.73 ± 4.48	11.0 ± 0.93	8.87 ± 0.74 <sup>a</sup>	8.47 ± 0.49 <sup>b</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.009 ± 0.003	0.010 ± 0.003	0.007 ± 0.001	0 007 ± 0 001	0 007 ± 0 001
Campesterol (µg/mg)	0.20 ± 0.08	0.63 ± 0.40	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>
Sitosterol (µg/mg)	0.049 ± 0.017	0.056 ± 0.027	0.025 ± 0.005	0.031 ± 0.014	0.018 ± 0.002 <sup>a</sup>
Campestanol (ng/mg)	5.37 ± 1.81	6.61 ± 2.55	17.7 ± 2.61 <sup>b</sup>	26.9 ± 9.69	18.7 ± 1.43 <sup>c</sup>
Sitostanol (ng/mg)	2.18 ± 1.14	1.34 ± 0.37	3.44 ± 0.73	4.63 ± 1.50	2.99 ± 0.24
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.80 ± 0.30	1.04 ± 0.31	0.68 ± 0.07	0.76 ± 0.12	0.86 ± 0.08
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	17.2 ± 5.40	83.4 ± 62.6	13.9 ± 3.34	12.9 ± 5.09	8.03 ± 1.44
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.18 ± 1.44	7.14 ± 4.89	2.25 ± 0.56	3.51 ± 1.69	2.14 ± 0.19
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.45 ± 0.14	0.83 ± 0.51	1.62 ± 0.34 <sup>b</sup>	3.07 ± 1.20	2.21 ± 0.13 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.18 ± 0.09	0.17 ± 0.09	0.31 ± 0.08	0.53 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.1 % Cholesterol

Tabelle A12. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	11.0 ± 2.86	10.0 ± 0.46	12.2 ± 1.27	11.1 ± 0.65	10.2 ± 1.81
Lathosterol (µg/mg)	0.012 ± 0.003	0.012 ± 0.003	0.014 ± 0.004	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.003
Campesterol (µg/mg)	0.33 ± 0.23	0.95 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.02
Sitosterol (µg/mg)	0.049 ± 0.0004	0.079 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.038 ± 0.008	0.033 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.026 ± 0.002 <sup>c</sup>
Campestanol (ng/mg)	5.21 ± 0.25	6.53 ± 0.21 <sup>b</sup>	25.3 ± 6.77 <sup>a</sup>	34.5 ± 7.03 <sup>b</sup>	35.7 ± 3.74 <sup>b</sup>
Sitostanol (ng/mg)	1.77 ± 0.34	1.29 ± 0.07	4.39 ± 0.95 <sup>a</sup>	5.01 ± 0.41 <sup>c</sup>	5.18 ± 0.90 <sup>b</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	1.13 ± 0.11	1.14 ± 0.28	1.20 ± 0.44	1.04 ± 0.08	1.18 ± 0.16
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	35.9 ± 35.7	95.7 ± 14.6	15.2 ± 3.51	11.3 ± 1.97	8.90 ± 0.70
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.68 ± 1.44	7.89 ± 1.40	3.12 ± 0.58	2.97 ± 0.52	2.57 ± 0.57
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.50 ± 0.13	0.65 ± 0.03	2.06 ± 0.42 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.46 <sup>c</sup>	3.51 ± 0.42 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.52 ± 0.18

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.1 % Cholesterol

Tabelle A13. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.97 ± 0.25	1.74 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.24	1.07 ± 0.29	1.13 ± 0.37
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	59.6 ± 7.12	381 ± 191	58.5 ± 0.59	43.3 ± 11.8	34.9 ± 8.56 <sup>a</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	31.2 ± 2.01	73.2 ± 44.8	19.5 ± 0.93 <sup>c</sup>	21.2 ± 8.53	14.6 ± 3.53 <sup>b</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	8.52 ± 1.47	31.7 ± 21.9	42.3 ± 7.64 <sup>b</sup>	67.2 ± 18.9 <sup>b</sup>	64.2 ± 12.5 <sup>a</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	3.32 ± 0.54	5.45 ± 3.63	11.4 ± 2.22 <sup>b</sup>	17.4 ± 5.97	13.9 ± 3.20 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.1 % Cholesterol

Tabelle A14. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	1.41 ± 0.34	2.19 ± 0.62	2.09 ± 0.71	1.65 ± 0.25	1.49 ± 0.24
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	61.8 ± 7.85	404 ± 17.3 <sup>c</sup>	64.1 ± 16.8	43.8 ± 13.4	31.1 ± 4.80 <sup>b</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	34.2 ± 2.22	91.3 ± 11.5 <sup>c</sup>	27.0 ± 10.6	22.7 ± 8.86	15.8 ± 1.75 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	8.24 ± 1.61	24.7 ± 2.93 <sup>c</sup>	64.1 ± 36.2	66.1 ± 33.3 <sup>a</sup>	68.9 ± 4.23 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	3.44 ± 0.63	4.67 ± 0.63	18.8 ± 11.5	16.7 ± 7.10	18.6 ± 2.95 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.1 % Cholesterol

Tabelle A15. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	5.95 ± 1.12	5.52 ± 0.79	6.48 ± 0.46	5.56 ± 0.88	4.93 ± 0.89
Lathosterol (µg/mg)	0.007 ± 0.002	0.010 ± 0.004	0.008 ± 0.006	0.010 ± 0.004	0.008 ± 0.003
Campesterol (µg/mg)	0.10 ± 0.02	0.25 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.07	0.06 ± 0.01 <sup>a</sup>
Sitosterol (µg/mg)	0.026 ± 0.008	0.030 ± 0.007	0.018 ± 0.002	0.027 ± 0.001	0.016 ± 0.005
Campestanol (ng/mg)	4.66 ± 0.82	5.92 ± 2.38	11.0 ± 2.43 <sup>a</sup>	11.9 ± 3.17 <sup>a</sup>	11.7 ± 1.21 <sup>c</sup>
Sitostanol (ng/mg)	1.50 ± 0.31	1.57 ± 0.59	3.35 ± 0.56 <sup>b</sup>	2.82 ± 0.86	2.70 ± 0.49 <sup>a</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	1.15 ± 0.13	1.78 ± 0.56	1.24 ± 0.87	1.76 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.32
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	17.0 ± 3.27	44.1 ± 8.82 <sup>b</sup>	13.8 ± 3.38	24.4 ± 14.5	11.7 ± 1.99
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.25 ± 0.75	5.33 ± 0.75	2.70 ± 0.10 <sup>a</sup>	5.00 ± 0.86	3.27 ± 0.62
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.79 ± 0.07	1.04 ± 0.30	1.71 ± 0.44 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.55 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.22 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.25 ± 0.017	0.28 ± 0.07	0.52 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.01 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.1 % Cholesterol



Tabelle A16. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1% Cholesterol</b>	<b>0.1% Cholesterol + 1% Sterolester</b>	<b>0.1% Cholesterol + 0.25% Stanolester</b>	<b>0.1% Cholesterol + 0.5% Stanolester</b>	<b>0.1% Cholesterol + 1% Stanolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	23.0 ± 10.1	19.0 ± 3.16	16.4 ± 2.79	27.8 ± 24.0	13.3 ± 4.40
Lathosterol (µg/mg)	0.022 ± 0.009	0.026 ± 0.009	0.017 ± 0.006	0.025 ± 0.020	0.014 ± 0.003
Campesterol (µg/mg)	0.37 ± 0.12	1.97 ± 0.71 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.02	0.39 ± 0.36	0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>
Sitosterol (µg/mg)	0.097 ± 0.040	0.187 ± 0.091	0.049 ± 0.003	0.100 ± 0.088	0.037 ± 0.014
Campestanol (ng/mg)	10.7 ± 3.24	15.9 ± 6.43	33.0 ± 5.97 <sup>b</sup>	89.8 ± 86.0	47.5 ± 15.8
Sitostanol (ng/mg)	3.74 ± 0.84	4.23 ± 1.96	5.91 ± 1.05 <sup>a</sup>	14.5 ± 13.0	7.54 ± 2.92
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.96 ± 0.06	1.38 ± 0.38	1.00 ± 0.19	0.94 ± 0.07	1.09 ± 0.17
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	16.4 ± 1.74	103 ± 32.7 <sup>a</sup>	17.0 ± 3.37	13.4 ± 2.66	12.3 ± 2.06
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	4.25 ± 0.15	9.67 ± 4.33	3.02 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.43 ± 1.04	2.73 ± 0.29 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.48 ± 0.06	0.83 ± 0.31	2.07 ± 0.56 <sup>b</sup>	3.01 ± 0.43 <sup>c</sup>	3.58 ± 0.28 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.17 ± 0.03	0.22 ± 0.09	0.37 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.1% Cholesterol

Tabelle A17. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1% Cholesterol</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	57.4 ± 8.34	51.7 ± 1.97	66.2 ± 7.70	53.5 ± 13.5	54.9 ± 3.18
Lathosterol (µg/mg)	0.19 ± 0.025	0.17 ± 0.026	0.21 ± 0.017	0.17 ± 0.051	0.18 ± 0.017
Campesterol (µg/mg)	0.033 ± 0.009	0.053 ± 0.015	0.037 ± 0.005	0.035 ± 0.019	0.027 ± 0.006
Sitosterol (µg/mg)	0.030 ± 0.015	0.027 ± 0.010	0.037 ± 0.003	0.034 ± 0.017	0.025 ± 0.009
Campestanol (ng/mg)	1.86 ± 1.04	1.70 ± 0.60	2.81 ± 0.37	3.37 ± 2.20	2.42 ± 0.89
Sitostanol (ng/mg)	1.32 ± 0.71	1.10 ± 0.42	1.64 ± 0.18	1.57 ± 0.76	1.22 ± 0.47
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	3.19 ± 0.13	3.29 ± 0.44	3.24 ± 0.60	3.18 ± 0.21	3.22 ± 0.12
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.59 ± 0.18	1.17 ± 0.55	0.56 ± 0.06	0.63 ± 0.18	0.50 ± 0.12
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.55 ± 0.34	0.52 ± 0.18	0.56 ± 0.04	0.61 ± 0.18	0.47 ± 0.17
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.034 ± 0.023	0.033 ± 0.012	0.043 ± 0.002	0.059 ± 0.026	0.044 ± 0.015
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.024 ± 0.013	0.021 ± 0.008	0.025 ± 0.001	0.028 ± 0.007	0.022 ± 0.008

Tabelle A18. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von homozygoten Watanabe Kaninchen nach 19-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 3, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.1 % Cholesterol</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Sterolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.25 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 0.5 % Stanolester</b>	<b>0.1 % Cholesterol + 1.0 % Stanolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	46.9 ± 9.87	48.1 ± 16.8	52.5 ± 14.3	48.8 ± 20.6	63.9 ± 5.10
Lathosterol (µg/mg)	0.14 ± 0.04	0.16 ± 0.06	0.16 ± 0.04	0.15 ± 0.06	0.18 ± 0.05
Campesterol (µg/mg)	0.027 ± 0.007	0.043 ± 0.007	0.031 ± 0.003	0.024 ± 0.011	0.031 ± 0.008
Sitosterol (µg/mg)	0.034 ± 0.020	0.027 ± 0.012	0.037 ± 0.002	0.027 ± 0.010	0.040 ± 0.016
Campestanol (ng/mg)	2.35 ± 1.54	1.70 ± 0.72	2.97 ± 0.27	2.44 ± 1.07	3.67 ± 1.40
Sitostanol (ng/mg)	1.61 ± 1.00	1.04 ± 0.50	1.65 ± 0.21	1.16 ± 0.50	1.61 ± 0.70
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	3.05 ± 0.55	3.47 ± 0.94	2.99 ± 0.08	3.12 ± 0.35	2.84 ± 0.61
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.62 ± 0.28	0.97 ± 0.35	0.61 ± 0.12	0.50 ± 0.07	0.49 ± 0.11
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.80 ± 0.63	0.62 ± 0.31	0.73 ± 0.16	0.57 ± 0.07	0.63 ± 0.25
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.057 ± 0.047	0.039 ± 0.020	0.059 ± 0.011	0.050 ± 0.006	0.058 ± 0.022
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.038 ± 0.029	0.025 ± 0.014	0.033 ± 0.007	0.024 ± 0.002	0.025 ± 0.011

Tabelle A19. Plasmakonzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol bei heterozygoten Watanabe Kaninchen vor und nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)

Sterol/Stanol	0.2 % Cholesterol			0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester			0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester			0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester		
	Tag1	Tag 120	Tag 150	Tag1	Tag 120	Tag 150	Tag1	Tag 120	Tag 150	Tag1	Tag 120	Tag 150
Cholesterol (mg/dl)	155 ± 44.9	588 ± 400 <sup>b</sup>	705 ± 530 <sup>a</sup>	150 ± 24.8	336 ± 194 <sup>a</sup>	312 ± 224	179 ± 64.0	247 ± 164	226 ± 178	182 ± 47.4	231 ± 141	235 ± 145
Lathosterol (mg/dl)	0.10 ± 0.05	0.45 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.04	0.20 ± 0.11	0.15 ± 0.10	0.13 ± 0.09	0.13 ± 0.10	0.12 ± 0.11	0.10 ± 0.04	0.16 ± 0.14	0.16 ± 0.15
Campesterol (mg/dl)	1.59 ± 0.39	5.41 ± 4.27 <sup>a</sup>	6.50 ± 5.57 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.30	2.03 ± 1.08	1.61 ± 1.04	2.10 ± 1.22	1.40 ± 0.71	1.28 ± 0.73	2.47 ± 1.14	24.7 ± 16.3 <sup>b</sup>	24.0 ± 16.4 <sup>b</sup>
Sitosterol (mg/dl)	0.56 ± 0.18	1.34 ± 0.87 <sup>a</sup>	1.63 ± 1.26 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.11	0.47 ± 0.15	0.38 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.48	0.33 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.76	2.53 ± 1.30 <sup>b</sup>	2.41 ± 1.44 <sup>b</sup>
Campestanol (µg/dl)	27.9 ± 6.25	167 ± 118 <sup>b</sup>	196 ± 158 <sup>a</sup>	26.1 ± 4.14	881 ± 401 <sup>c</sup>	741 ± 403 <sup>c</sup>	35.7 ± 17.6	814 ± 336 <sup>c</sup>	668 ± 261 <sup>c</sup>	44.5 ± 16.7	201 ± 63.7 <sup>c</sup>	194 ± 78.3 <sup>c</sup>
Sitostanol (µg/dl)	14.3 ± 3.39	51.9 ± 31.3 <sup>b</sup>	57.2 ± 40.6 <sup>a</sup>	15.1 ± 3.18	229 ± 83.5 <sup>c</sup>	185 ± 82.7 <sup>c</sup>	23.4 ± 13.4	212 ± 94.0 <sup>c</sup>	172 ± 75.3 <sup>c</sup>	33.0 ± 13.4	47.2 ± 27.0 <sup>a</sup>	47.3 ± 31.0
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	0.64 ± 0.18	0.68 ± 0.17	0.62 ± 0.15	0.68 ± 0.21	0.66 ± 0.28	0.55 ± 0.20	0.75 ± 0.35	0.55 ± 0.11	0.59 ± 0.18	0.54 ± 0.13	0.64 ± 0.20	0.61 ± 0.24
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	10.7 ± 2.69	8.60 ± 1.82	8.44 ± 1.67 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.82	6.24 ± 0.97 <sup>c</sup>	5.63 ± 1.36 <sup>c</sup>	11.6 ± 3.98	6.55 ± 2.65 <sup>c</sup>	6.90 ± 2.67 <sup>c</sup>	13.2 ± 3.10	107 ± 29.4 <sup>c</sup>	101 ± 16.7 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	3.80 ± 1.22	2.50 ± 0.53 <sup>a</sup>	2.56 ± 0.73 <sup>a</sup>	3.71 ± 0.89	1.76 ± 0.74 <sup>c</sup>	1.66 ± 0.83 <sup>c</sup>	4.29 ± 1.82	1.86 ± 1.05 <sup>c</sup>	1.92 ± 1.13 <sup>c</sup>	5.76 ± 2.44	11.7 ± 2.89 <sup>c</sup>	10.8 ± 2.83 <sup>b</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.19 ± 0.05	0.30 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.04	3.10 ± 1.24 <sup>c</sup>	2.95 ± 1.43 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.07	4.47 ± 2.16 <sup>c</sup>	4.50 ± 2.71 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.05	1.03 ± 0.33 <sup>c</sup>	0.96 ± 0.26 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.84 ± 0.43 <sup>c</sup>	0.79 ± 0.45 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.05	1.10 ± 0.46 <sup>c</sup>	1.08 ± 0.57 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.06	0.22 ± 0.06	0.21 ± 0.06

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 Tag 1 vs. Tag 120/Tag 150

Tabelle A20. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Leber von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	17.3 ± 9.40	11.2 ± 4.17	10.6 ± 3.52	7.62 ± 1.71 <sup>a</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.009 ± 0.004	0.007 ± 0.003	0.008 ± 0.006	0.008 ± 0.001
Campesterol (µg/mg)	0.120 ± 0.06	0.065 ± 0.027 <sup>a</sup>	0.070 ± 0.023 <sup>a</sup>	0.730 ± 0.13 <sup>c</sup>
Sitosterol (µg/mg)	0.039 ± 0.012	0.021 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.023 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.064 ± 0.016 <sup>b</sup>
Campestanol (ng/mg)	6.17 ± 2.94	25.1 ± 7.67 <sup>c</sup>	25.7 ± 6.53 <sup>c</sup>	8.25 ± 2.14
Sitostanol (ng/mg)	1.60 ± 0.46	3.75 ± 0.72 <sup>c</sup>	4.55 ± 0.97 <sup>c</sup>	1.32 ± 0.24
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.59 ± 0.17	0.76 ± 0.58	0.92 ± 0.89	1.05 ± 0.36 <sup>b</sup>
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	7.26 ± 1.10	6.05 ± 1.93	7.11 ± 3.04	101 ± 26.5 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.65 ± 1.06	2.15 ± 0.88	2.48 ± 1.21	8.91 ± 3.23 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.38 ± 0.07	2.43 ± 0.86 <sup>c</sup>	2.75 ± 1.27 <sup>c</sup>	1.13 ± 0.38 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.11 ± 0.04	0.37 ± 0.13 <sup>c</sup>	0.49 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.2 % Cholesterol

Tabelle A21. Ratios der Sterole und Stanole zum Cholesterol in der Galle von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Lathosterol/ Cholesterol (µg/mg)	1.22 ± 0.67	1.55 ± 0.63	1.77 ± 1.05	2.25 ± 1.18 <sup>a</sup>
Campesterol/ Cholesterol (µg/mg)	38.4 ± 14.0	25.8 ± 7.31 <sup>a</sup>	31.8 ± 16.0	466 ± 143 <sup>b</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (µg/mg)	26.6 ± 8.17	11.6 ± 3.41 <sup>b</sup>	15.9 ± 6.72 <sup>a</sup>	79.4 ± 29.0 <sup>b</sup>
Campestanol/ Cholesterol (µg/mg)	9.61 ± 2.76	56.2 ± 13.9 <sup>b</sup>	91.6 ± 31.4 <sup>b</sup>	41.8 ± 13.8 <sup>b</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (µg/mg)	2.80 ± 0.88	12.6 ± 3.94 <sup>b</sup>	20.6 ± 5.59 <sup>b</sup>	4.46 ± 1.52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.2 % Cholesterol

Tabelle A22. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol in der Intima der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	72.89 ± 57.0	12.71 ± 8.47 <sup>a</sup>	9.00 ± 4.96 <sup>b</sup>	7.73 ± 2.98 <sup>b</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.030 ± 0.020	0.011 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.009 ± 0.003 <sup>a</sup>
Campesterol (µg/mg)	0.620 ± 0.56	0.062 ± 0.044 <sup>a</sup>	0.038 ± 0.028 <sup>a</sup>	0.700 ± 0.300
Sitosterol (µg/mg)	0.160 ± 0.13	0.023 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.015 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.045 ± 0.015 <sup>a</sup>
Campestanol (ng/mg)	32.7 ± 28.2	33.6 ± 23.2	26.2 ± 13.8	10.1 ± 2.31 <sup>a</sup>
Sitostanol (ng/mg)	7.07 ± 5.31	5.29 ± 3.04	4.50 ± 2.31	1.28 ± 0.25 <sup>a</sup>
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.66 ± 0.45	1.21 ± 0.80	1.45 ± 0.79 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.60 <sup>a</sup>
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	7.65 ± 1.68	4.98 ± 1.38 <sup>b</sup>	4.01 ± 1.77 <sup>c</sup>	89.5 ± 11.7 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.67 ± 1.00	2.27 ± 0.90	1.88 ± 0.66	5.96 ± 1.12 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.46 ± 0.09	2.70 ± 0.46 <sup>c</sup>	2.93 ± 0.74 <sup>c</sup>	1.38 ± 0.29 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.12 ± 0.05	0.44 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.50 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.2 % Cholesterol

Tabelle A23. Konzentrationen von Sterolen und Stanolen sowie deren Ratio zum Cholesterol im Gehirn von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)

<b>Sterol/Stanol</b>	<b>0.2 % Cholesterol</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester</b>	<b>0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester</b>
Cholesterol (µg/mg)	52.2 ± 7.43	59.3 ± 12.5	61.6 ± 17.3	70.0 ± 17.2 <sup>a</sup>
Lathosterol (µg/mg)	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.17 ± 0.05	0.19 ± 0.03 <sup>b</sup>
Campesterol (µg/mg)	0.028 ± 0.006	0.023 ± 0.007	0.024 ± 0.010	0.260 ± 0.070 <sup>c</sup>
Sitosterol (µg/mg)	0.016 ± 0.002	0.015 ± 0.004	0.014 ± 0.005	0.029 ± 0.006 <sup>c</sup>
Campestanol (ng/mg)	1.14 ± 0.28	4.72 ± 1.42 <sup>c</sup>	5.08 ± 2.01 <sup>c</sup>	3.61 ± 0.88 <sup>c</sup>
Sitostanol (ng/mg)	0.90 ± 0.13	1.76 ± 0.47 <sup>c</sup>	1.45 ± 0.55 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.17
Lathosterol/ Cholesterol (ng/mg)	2.66 ± 0.31	2.54 ± 0.49	2.72 ± 0.37	2.73 ± 0.38
Campesterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.54 ± 0.08	0.40 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.07 <sup>c</sup>	3.81 ± 0.71 <sup>c</sup>
Sitosterol/ Cholesterol (ng/mg)	0.31 ± 0.03	0.26 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.08 <sup>c</sup>
Campestanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.02 ± 0.01	0.080 ± 0.021 <sup>c</sup>	0.080 ± 0.021 <sup>c</sup>	0.053 ± 0.013 <sup>c</sup>
Sitostanol/ Cholesterol (ng/mg)	0.018 ± 0.005	0.030 ± 0.006 <sup>c</sup>	0.023 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.012 ± 0.002 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> p ≤ 0.05, <sup>b</sup> p ≤ 0.01, <sup>c</sup> p ≤ 0.001 vs. 0.2 % Cholesterol



Tabelle A24. Plaquefläche und die Ratio von Intima:Media der Aorta von heterozygoten Watanabe Kaninchen nach 150-tägiger Fütterung mit unterschiedlichen Futtern (n = 9, 0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester n = 8, MW ± SD)\*

	<b>Plaquefläche (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Ratio Intima : Media</b>
0.2 % Cholesterol	0.37 ± 0.65	0.13 ± 0.22
0.2 % Cholesterol + 1.7 % Stanolester	0.01 ± 0.02	0.001 ± 0.010
0.2 % Cholesterol + 3.4 % Stanolester	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.2 % Cholesterol + 3.4 % Sterolester	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

\*the data used to perform the correlations is unpublished and may be subject to changes upon later publication and the data is owned by the Danish Institute for Food and Veterinary Research, Soeborg, Denmark