

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften

angefertigt in der
Abteilung für Klinische Pharmakologie
der medizinischen Einrichtungen der Universität Bonn

**Gaschromatographisch/massenspektrometrische Quantifizierung von oral verabreichten
deuterten Sterolen im Serum als Indikatoren für die intestinale Sterolresorption
im Rahmen einer klinischen Studie zur Wirkung von Ezetimib und Simvastatin**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Grades
Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaften
(Dr. oec. troph.)
der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am
29.03.2007

von
Kristin Lanfer

aus
Stuttgart-Bad Cannstatt

Referent: Prof. Dr. Klaus von Bergmann

Koreferent: Prof. Dr. Peter Stehle

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere

- Herrn Prof. Dr. K. von Bergmann für die Überlassung des Themas, für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die wertvollen Diskussionsbeiträge.
- Herrn Prof. Dr. P. Stehle für die Übernahme des Koreferates und die konstruktiven Anregungen bei der Erstellung des Manuskriptes.
- allen Mitarbeitern, die zeitgleich mit mir in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn gearbeitet haben, für die sehr gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und den individuellen Beitrag, den jeder Einzelne zum Gelingen der vorliegenden Arbeit geleistet hat.
- Dr. Wolfgang Prange für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die sehr gute Einarbeitung in die Methodik und Gerätschaften sowie die Beantwortung vieler Fragen besonders zu Beginn meiner Promotion.
- Silvia Friedrichs für die Bestimmung der Cholesterolresorptions- und Cholesterolsynthesedaten. Dr. Harald Brzezinka für die Synthese diverser deuterierter Standards.
- Frau Warnken vom Hochschulrechenzentrum der Universität Bonn für wertvolle Hinweise zur statistischen Auswertung der Daten.
- meinen Eltern Hedwig und Hermann, meinen Schwestern Babette und Anne, meinen Freunden und ganz besonders Henrik dafür, dass sie mich auf so vielerlei Weise unterstützt und motiviert haben.

Kurzzusammenfassung

Einleitung: Zur Bestimmung der intestinalen Resorption von Sterolen in klinischen Studien wird die *continuous feeding dual stable isotope method* verwendet. Dazu nehmen die Studienteilnehmer mit Deuterium (D) markierte Sterole oral zu sich und danach wird der Anteil der nicht-resorbierten markierten Sterole in den Faeces bestimmt. Das regelmäßige Sammeln der Faecesproben erfordert eine gute Compliance der Studienteilnehmer. Eine Quantifizierung der resorbierten deuterierten Sterole im Serum wurde bisher aufgrund ihrer sehr niedrigen Konzentrationen im Serum nicht durchgeführt. **Ziel** der vorliegenden Arbeit war es, eine gaschromatographisch/massenspektrometrische (GC/MS) Methode zur Quantifizierung von deuteriertem und natürlichem Cholesterol, Campesterol und Sitosterol im Serum aufzubauen, um anschließend den Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen der Sterole und der Cholesterolresorption zu untersuchen.

Methoden: Von 37 männlichen Patienten mit Hypercholesterolämie wurden insgesamt 148 Blutproben untersucht. Die Patienten nahmen an einer Cross-Over-Studie zur Wirkung von Placebo, Simvastatin, Ezetimib und der Kombination von Simvastatin plus Ezetimib auf die Cholesterolresorption und -synthese teil. In der jeweils letzten Woche der vier jeweils siebenwöchigen Behandlungsphasen nahmen die Studienteilnehmer dreimal täglich eine Kapsel mit D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol sowie D₄-Sitostanol als nicht resorbierbaren Marker oral zu sich. An den letzten vier Tagen der Kapseleinnahme wurden Stuhlproben für die Bestimmung der Sterolresorption gesammelt. Die Serumproben wurden jeweils am Ende jeder Behandlungsphase gewonnen und mit den Faecesproben bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Ergebnisse: Um die deuterierten Sterole simultan mit den entsprechend natürlich vorkommenden Sterolen in den Serumproben zu quantifizieren, wurden, basierend auf einer etablierten Methode, zuverlässige GC/MS-Methoden mit hohem Nachweisvermögen erfolgreich aufgebaut, validiert und angewendet. Die absoluten und insbesondere cholesterol-standardisierten Serumkonzentrationen von D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol korrelierten unter der Behandlung mit Placebo signifikant positiv mit der Cholesterolresorption (r zwischen 0,578 und 0,731; $P < 0,001$ und $n = 33$ für alle). Die cholesterol-standardisierte Serumkonzentration von D₆-Cholesterol war unter Simvastatin im Mittel um 7,5 % erhöht gegenüber Placebo ($P = 0,037$) und unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib signifikant erniedrigt (-52 % bzw. -47 %, $P < 0,001$ für beide vs. Placebo; $P = 0,114$ Ezetimib vs. Simvastatin plus Ezetimib). Die mittleren Änderungen des Serumquotienten reflektierten die Änderungen der Cholesterolresorption in den Behandlungsphasen (Simvastatin: +7 %, $P = 0,051$; Ezetimib: -57 %, $P < 0,001$; Simvastatin plus Ezetimib: -52 %, $P < 0,001$ vs. Placebo, $P = 0,186$ vs. Ezetimib).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die cholesterol-standardisierten Serumkonzentrationen von oral verabreichtem D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol Indikatoren für die Effizienz der Sterolresorption bei Hypercholesterolämiepatienten darstellen und dass insbesondere die Quantifizierung von D₆-Cholesterol im Verhältnis zu Cholesterol im Serum mittels GC/MS als vereinfachtes Verfahren anstelle der *continuous feeding dual stable isotope method* verwendet werden kann, um Änderungen der Cholesterolresorption zu untersuchen.

Abstract

Introduction: The *continuous feeding dual stable isotope method* is applied for the determination of intestinal absorption of sterols in clinical trials. For this purpose deuterium-labeled (d) sterols are administered orally and afterwards the proportion of non-absorbed labeled sterols is determined in feces of the study participants. The regular collection of fecal samples requires a good compliance of the study participants. Quantification of absorbed deuterated sterols in serum has not been performed yet due to their very low concentrations in serum. **Objective:** The objective of the present work was to establish a gaschromatographic/mass spectrometric (GC/MS) method for quantification of deuterated and natural cholesterol, campesterol and sitosterol in serum in order to examine the relation between serum concentrations of sterols and cholesterol absorption.

Methods: 148 blood samples of 37 male patients with hypercholesterolemia were assayed. The patients took part in a cross-over study on the effects of placebo, simvastatin, ezetimibe and a combination of simvastatin and ezetimibe on cholesterol absorption and synthesis. In the last week of each of the four seven-week-treatment periods study participants swallowed a capsule three times daily containing the deuterated sterols d₆-cholesterol, d₆-campesterol, d₆-sitosterol together with d₄-sitostanol as non-absorbable marker. Fecal samples were collected on the last four days of capsule intake for determination of sterol absorption. Serum samples were attained at the end of each treatment period and were stored frozen together with the fecal samples at -20°C until analysis.

Results: For the simultaneous determination of the labeled and corresponding non-labeled sterols in serum samples reliable GC/MS-methods with high sensitivity were established, validated, and successfully applied. The absolute and particularly the cholesterol-standardized concentrations of d₆-cholesterol, d₆-campesterol, d₆-sitosterol in serum exhibited a significantly positive correlation with cholesterol absorption under placebo treatment (r between 0,578 and 0,731; $P < 0,001$ and $n = 33$ for all). D₆-cholesterol (expressed as ratio to cholesterol) in serum was increased by 7,5 % on average under treatment with simvastatin compared to placebo ($P = 0,037$) and significantly decreased by ezetimibe monotherapy and combination treatment with ezetimibe plus simvastatin (-52 % and -47 %, respectively; $P < 0,001$ for both vs. placebo; $P = 0,114$ for ezetimibe vs. simvastatin plus ezetimibe). The mean changes of the ratio d₆-cholesterol/cholesterol in serum reflected the changes of cholesterol absorption during the treatment periods (simvastatin: +7 %, $P = 0,051$; ezetimibe: -57 %, $P < 0,001$; simvastatin plus ezetimibe: -52 %; $P < 0,001$ vs. placebo, $P = 0,186$ vs. ezetimibe).

Conclusion: The results suggest that cholesterol-standardized concentrations of orally administered d₆-cholesterol, d₆-campesterol, d₆-sitosterol in serum are indicators of cholesterol absorption efficiency in patients with hypercholesterolemia and that quantification of particularly d₆-cholesterol as ratio to cholesterol in serum by GC/MS can be used as an easier approach to replace the *continuous feeding dual stable isotope method* for examining changes in cholesterol absorption.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen und Formelzeichen

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	Funktion und Vorkommen von Sterolen	2
1.2	Sterolstoffwechsel	5
1.2.1	Die intestinale Resorption von Sterolen	7
1.2.2	Transport der Sterole in Lymphe und Blut	10
1.2.3	Sterolelimination	12
1.3	Pharmakologische Hemmung der intestinalen Sterolresorption	13
1.3.1	Hintergrund.....	13
1.3.2	Ezetimib.....	14
1.4	Methoden zur Bestimmung der intestinalen Sterolresorption	15
1.5	Ziel der Arbeit	17
2	KLINISCHE STUDIE	18
2.1	Studiendesign	18
2.2	Studienteilnehmer	19
3	MATERIAL	21
3.1	Chemikalien, Lösungen und Reagenzien	21
3.2	Geräte und Labormaterialien für die Serumaufbereitung	22
3.2.1	Geräte	22
3.2.2	Labormaterialien.....	22
3.3	Analyseinstrumente	23
3.3.1	GC/FID	23
3.3.2	GC/MS.....	23
3.3.3	HPLC	23
3.4	Standard- und Kalibrierlösungen	24
3.5	Poolseren	24

4	METHODEN	25
4.1	Bestimmung der deuterierten und natürlichen Sterole im Serum	25
4.1.1	Theoretische Abschätzung der Sterolkonzentrationen in den Serumproben	25
4.1.2	Methodischer Ansatz	27
4.1.3	Bestimmung der deuterierten und natürlichen Phytosterole im Serum	28
4.1.3.1	<i>Alkalische Hydrolyse und Extraktion.....</i>	<i>29</i>
4.1.3.2	<i>Abtrennung des Cholesterols mittels präparativer HPLC.....</i>	<i>30</i>
4.1.3.3	<i>Derivatisierung</i>	<i>33</i>
4.1.3.4	<i>GC/MS-Analyse</i>	<i>33</i>
4.1.4	Bestimmung von deuteriertem und natürlichem Cholesterol im Serum.....	38
4.1.4.1	<i>Serumaufarbeitung</i>	<i>39</i>
4.1.4.2	<i>GC/MS-Analyse</i>	<i>39</i>
4.1.5	Maßnahmen zur Qualitätssicherung	42
4.1.6	Methodenvalidierung.....	43
4.1.6.1	<i>Selektivität</i>	<i>44</i>
4.1.6.2	<i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....</i>	<i>44</i>
4.1.6.3	<i>Kalibrierung</i>	<i>44</i>
4.1.6.4	<i>Richtigkeit.....</i>	<i>46</i>
4.1.6.5	<i>Präzision.....</i>	<i>47</i>
4.2	Bestimmung von neutralen Sterolen mittels GC/FID	48
4.2.1	Probenaufbereitung.....	48
4.2.2	GC/FID	49
4.3	Bestimmung der Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese.....	50
4.4	Statistische Auswertung der klinischen Daten	51
5	ERGEBNISSE.....	53
5.1	Methodenvalidierung.....	53
5.1.1	Selektivität.....	53
5.1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze.....	57
5.1.3	Kalibrierung.....	58
5.1.4	Präzision und Richtigkeit.....	60
5.2	Klinische Studie	62
5.2.1	Datenscreening	62
5.2.2	Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese	64
5.2.3	Serumsterole	67
5.2.3.1	<i>Natürliche Serumsterole</i>	<i>67</i>
5.2.3.2	<i>Deuterierte Serumsterole.....</i>	<i>69</i>

5.2.3.3	<i>Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole</i>	74
5.2.3.4	<i>Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten und natürlichen Sterole</i>	75
5.2.4	Zusammenhang zwischen der Cholesterolresorption und den Serumsterolen	77
5.2.5	Zusammenhang zwischen der Cholesterolsynthese und den Serumsterolen.....	81
6	DISKUSSION	84
6.1	Methoden zur Bestimmung der deuterierten und natürlichen Serumsterole	84
6.1.1	Serumaufarbeitung.....	86
6.1.2	Selektivität.....	87
6.1.3	Nachweisvermögen	87
6.1.4	Linearität.....	89
6.1.5	Präzision	90
6.1.6	Richtigkeit	91
6.2	Ergebnisse der klinischen Studie	93
6.2.1	Natürliche und deuterierte Serumsterole	94
6.2.2	Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese	96
6.2.3	Zusammenhang zwischen der Cholesterolresorption und den Serumsterolen	98
6.2.4	Bestimmung der deuterierten Serumsterole als Indikatoren für die Cholesterolresorption im Vergleich zu bestehenden Methoden zur Cholesterolresorptionsbestimmung.....	105
6.2.5	Zusammenhang zwischen der Phytosterolresorption und den Serumsterolen.....	109
6.3	Schlussfolgerung	112
7	LITERATURVERZEICHNIS	115
	ANHANG	128

Abkürzungen und Formelzeichen

ABC	ATP-Binding-Cassette-Transporter
ACAT	Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase
APN	Aminopeptidase N
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorbance Unit
BMI	Body-Mass-Index
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterolestertransferprotein
CMR	Chylomikronen-Remnant
CYP3A4	Cytochrom P450 der Isoform 3A4
d	Tag
D	Deuterium (^2H)
EI	Elektronenstoß (engl. electron impact)
eV	Elektornenvolt
FDA	Amerikanische Nahrungs- und Arzneimittelbehörde (engl. Food and Drug Administration)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie bzw. Gaschromatograph
GC/FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion
GC/MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
HDL	High-Density-Lipoprotein
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
HWZ	Halbwertszeit
i.D.	innerer Durchmesser
IDL	Intermediate-Density-Lipoprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase

LXR	Leber-X-Rezeptor
<i>m</i>	Masse
mg	Milligramm
min	Minute
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
MTP	mikrosomales Triglyzeridtransferprotein
MW	Mittelwert (arithmetischer Mittelwert)
<i>n</i>	Stichprobenumfang
<i>N</i>	Normallösung (1 mol/l)
ng	Nanogramm
n. I.	nach Injektion
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1-Protein
<i>P</i>	Wahrscheinlichkeit
pg	Picogramm
p.A.	pro analysi, für die Analyse
PL	Phospholipid
PDA	Photodiodenarray-Detektor
R	Auflösung
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
s	Sekunde
SR-B1	Scavenger-Rezeptor B1
SD	Standardabweichung
SIM	Selective Ion Monitoring
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis (engl. signal to noise)
TMS	Trimethylsilylierung bzw. Trimethylsilyl-
TG	Triglyzerid
U	Umdrehung
V	Volt
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
<i>v/v</i>	nach Volumen
<i>w/w</i>	nach Gewicht
<i>z</i>	Ladung

1 EINFÜHRUNG

Laut Weltgesundheitsorganisation sterben jährlich schätzungsweise 3,8 Millionen Männer und 3,4 Millionen Frauen an der Koronaren Herzkrankheit (KHK). Die KHK ist damit die weltweit häufigste Todesursache. Aufgrund verbesserter Prävention, Diagnose und Therapie ist die KHK-Todesrate in den westlichen Industrieländern in den letzten Jahren bereits zurückgegangen, insgesamt ist jedoch mit einem weiteren Anstieg der KHK-Mortalität – insbesondere in den Entwicklungsländern – zu rechnen (1). Nicht zuletzt durch die damit verbundenen hohen Gesundheitskosten ist es notwendig, Maßnahmen zur Prävention und Therapie der KHK stetig weiter zu entwickeln und zu verbessern.

In vielen Interventionsstudien konnte gezeigt werden, dass die medikamentöse Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterols zu einer Verminderung der KHK und darüber hinaus zu einer Senkung der Gesamtmortalität führt (2-7). Die Hemmung der endogenen Cholesterolsynthese mit Statinen (Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase-Inhibitoren) ist die effektivste Maßnahme, um die Gesamt- und LDL-Cholesterolkonzentration im Serum zu senken. Dennoch erreichen nicht alle Patienten unter Monotherapie mit einem Statin die in Leitlinien geforderten LDL-Cholesterol-Zielkonzentrationen (8, 9). Mit der Zulassung von Ezetimib Ende des Jahres 2002 in Deutschland bietet sich nun eine neue Therapiestrategie an. Ezetimib hemmt die intestinale Resorption von mit der Nahrung zugeführtem und biliär sezerniertem Cholesterol. Durch die kombinierte Gabe von Ezetimib mit einem Statin wird die LDL-Cholesterolkonzentration im Serum stärker gesenkt als unter Höchstdosis mit einem Statin und damit auch die Gefahr der Nebenwirkungen vermindert (10, 11). Ezetimib senkt außerdem auch deutlich die Serumkonzentrationen der Phytosterole Campesterol und Sitosterol – sowohl bei Patienten mit Hypercholesterolämie (12) als auch Phytosterolämie (13).

Um die Regulation der Sterolhomöostase im Körper unter der Behandlung mit Medikamenten wie Ezetimib und Statinen besser zu verstehen, ist es notwendig, die Wirkung der Medikamente auch auf die direkten Regulationspunkte der Sterolhomöostase wie Resorption und Synthese zu erfassen. Es wurden daher in den letzten Jahrzehnten mehrere Methoden entwickelt, um die intestinale Sterolresorption und die endogene Cholesterolsynthese beim Menschen zu bestimmen (14-16). Sie sind aber größtenteils komplizierte, material- und zeitaufwendige Verfahren, die für Routinemessungen ungeeignet sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die Serumkonzentrationen von mit stabilen Isotopen markierten Sterolen nach deren oraler Gabe als Indikatoren für die Cholesterolresorption bestimmt werden können.

1.1 Funktion und Vorkommen von Sterolen

Sterole (Sterine)¹ sind neben Gallensäuren und Steroidhormonen die wichtigste Gruppe der Steroide. Nach ihrer Herkunft unterscheidet man zwischen tierischen bzw. menschlichen Sterolen (Zoosterole), pflanzlichen Sterolen (Phytosterole) und Sterolen in Pilzen (Mykosterole) (17).

Cholesterol (Cholesterin) ist das am häufigsten vorkommende Sterol im Mensch. Es macht insgesamt ungefähr 0,2 % des Körpergewichts aus und befindet sich zu rund 75 % im zentralen Nervensystem, Bindegewebe, Muskeln und Haut und zu nur circa 10 % in Blut und Leber (18). Im Körper erfüllt Cholesterol wichtige Funktionen: Es ist integraler, strukturgebender Bestandteil der Zellmembran und dient als Ausgangssubstrat für die Synthese von Gallensäuren, Steroidhormonen und Calciferolen (17, 19). Mittlerweile weiß man, dass Cholesterol auch prägend für die seitliche Struktur der Membran ist. An der exoplasmatischen Membranseite lassen sich Mikromembrandomänen finden, in denen sich vermehrt Cholesterol und Sphingolipide anreichern (20, 21). Neuere Studienergebnisse zeigen, dass diese so genannten *lipid rafts* an Signalkaskaden und der Immunantwort beteiligt sind (22), eine Rolle beim Eindringen von Bakterien in die Zelle spielen (23) und möglicherweise entscheidend zur Regulation der Cholesterolhomöostase beitragen (20). Cholesterol ist weiterhin notwendig für die Funktion von so genannten *hedgehog*-Proteinen, die als Signalproteine eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielen (24, 25).

Die Phytosterole sind – analog zum Cholesterol im tierischen Gewebe – wichtige Bestandteile der Zellmembran von Pflanzen. Im Gegensatz zu Cholesterol werden Phytosterole im Körper nicht synthetisiert, sondern ausschließlich mit der Nahrung zugeführt (26). Die pflanzlichen Sterole Sitosterol und Campesterol sind, mit einem Anteil von rund 65 % für Sitosterol und 30 % für Campesterol, die am häufigsten in der Nahrung vorkommenden Phytosterole (27). Sie weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Cholesterol auf:

¹ Im deutschen Sprachgebrauch findet sich häufig die Bezeichnung *Sterine*. In der vorliegenden Arbeit wird in Anlehnung an den englischen Sprachgebrauch und hinsichtlich der Einhaltung einer gewissen Systematik (Sterole sind Steroidalkohole und Verbindungen mit einer alkoholischen Hydroxylgruppe weisen normal die Endung –*ol* auf) der Begriff *Sterole* verwendet.

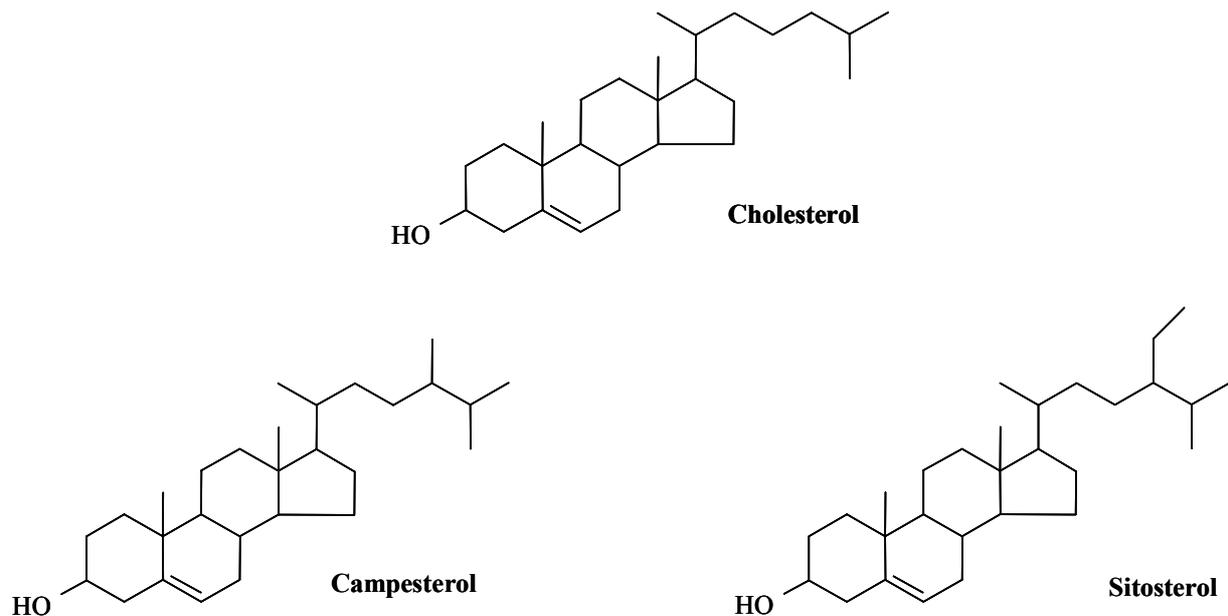


Abbildung 1.1 Strukturformel von Cholesterol (Cholest-5-en-3 β -ol) und den Phytosterolen Campesterol (24R-Methyl-cholest-5-en-3 β -ol) und Sitosterol (24R-Ethylcholest-5-en-3 β -ol).

Campesterol unterscheidet sich vom Cholesterol nur durch eine zusätzliche Methylgruppe und Sitosterol durch eine zusätzliche Ethylgruppe am Kohlenstoffatom C-24 der Seitenkette (**Abbildung 1.1**). Die drei Sterole besitzen zwischen C-5 und C-6 eine Doppelbindung. Die gesättigten Abkömmlinge der Sterole ohne Doppelbindung tragen in der trivialen Nomenklatur die Endung *-stanol* (z.B. Sitostanol).

Die Phytosterole liegen hauptsächlich in fettreichen Pflanzenteilen vor. Nahrungsmittel wie pflanzliche Öle, Nüsse und Saaten weisen daher einen hohen Phytosterolgehalt auf, während Gemüse und Obst nur sehr geringe Mengen enthalten (**Tabelle 1.1**). Der Anteil der veresterten Phytosterole in den natürlichen Lebensmitteln schwankt zwischen 10 % bis 80 % (28).

Es ist seit langem bekannt, dass Phytosterole in hoher Dosierung mit der Nahrung zugeführt die Cholesterolkonzentration im Serum senken, indem sie die Resorption von Cholesterol im Darm hemmen (29-32). Seit dem Jahr 2000 sind daher in Deutschland Lebensmittel, die mit pflanzlichen Stanol- oder Sterolestern angereichert sind (z.B. Margarine, Milch, Yoghurt), auf dem Markt. Diese Lebensmittel enthalten die größte Menge an Phytosterolen bezogen auf die verzehrte Menge (bis zu 7,5 g/100 g).

Cholesterol ist nur in Lebensmitteln tierischen Ursprungs enthalten (**Tabelle 1.2**) und liegt dort frei oder in unterschiedlichem Ausmaß mit einer Fettsäure (hauptsächlich Linolensäure) verestert vor (33). Die Zufuhr über die Nahrung erfolgt hauptsächlich mit Eiern, Fleisch und Wurstwaren sowie mit Butter, Milch und Milchprodukten (34).

Tabelle 1.1 Phytosterolgehalt (mg/100 g) in ausgewählten Lebensmitteln (28, 35)

Lebensmittel	Gesamtsterole	Sitosterol	Campesterol
Öle, nicht raffiniert			
Olivenöl	232	202	7
Rapsöl	513	284	156
Sonnenblumenöl	725	465	69
Nüsse und Saaten			
Mandeln	143	122	5
Sesamsaaten	714	413	91
Sonnenblumenkerne	534	349	61
Getreide			
Mais	178	120	32
Roggen	91-110	421	159
Weizen	69	40	27
Obst und Gemüse			
Äpfel	12	11	1
Bananen	16	11	2
Möhren	12	7	1
Tomaten	7	3	1

Tabelle 1.2 Cholesterolgehalt (mg/100 g) in ausgewählten Lebensmitteln (36)

Lebensmittel	Cholesterol
Hühnerleber	492
Hühnerei	396
Kalbsleber	360
Butter	239
Gouda	114
Schinken, roh	96
Hering	77
Schweinefilet	55
Vollmilch	12
Buttermilch	4
Obst und Gemüse	0

1.2 Sterolstoffwechsel

Mit der Nahrung gelangen zwischen <math>< 50\text{ mg}</math> (bei reinen Vegetariern) und 750 mg Cholesterol pro Tag in den Darm (37). Mit der Galle werden täglich zusätzlich 500 bis 2400 mg nicht verestertes Cholesterol in das Darmlumen sezerniert (38). Das im Darm zur Resorption zur Verfügung stehende Cholesterol stammt damit zu einem geringeren Teil aus exogenen und zu einem größeren Teil aus endogenen Quellen (**Abbildung 1.2**). Die intestinale Resorption von Cholesterol ist ein komplexer Prozess, in den mehrere verschiedene Proteine involviert sind (siehe Kapitel 1.2.1). Die durchschnittliche Cholesterolresorptionsrate liegt beim Menschen bei 50 %, weist aber eine hohe inter-individuelle Schwankung (20 % bis 80 %) auf (12, 39, 40). Mit dem Stuhl werden täglich rund 500-2000 mg Cholesterol ausgeschieden und diese Menge muss wieder ersetzt werden. Das resorbierte Cholesterol aus der Nahrung deckt jedoch nur einen Teil des Cholesterolbedarfs, weiter benötigtes Cholesterol wird *de novo* synthetisiert. Prinzipiell sind alle Gewebe zur Synthese von Cholesterol befähigt, von quantitativer Bedeutung sind jedoch nur die Leber und das intestinale Gewebe (41). Die körpereigene Synthese des Cholesterols wird zum Teil durch die Aufnahme des Cholesterols aus der Nahrung reguliert. Ein hohes Angebot an freiem Cholesterol in der Leberzelle supprimiert die hepatische β -Hydroxy- β -methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), das Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese, und aktiviert die Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT), die freies Cholesterol verestert und damit in seine Speicherform überführt (42). Bei normalen Ernährungsbedingungen stammen rund 60 bis 80 % des im Körper vorliegenden Cholesterols aus der endogenen *de novo*-Synthese (43).

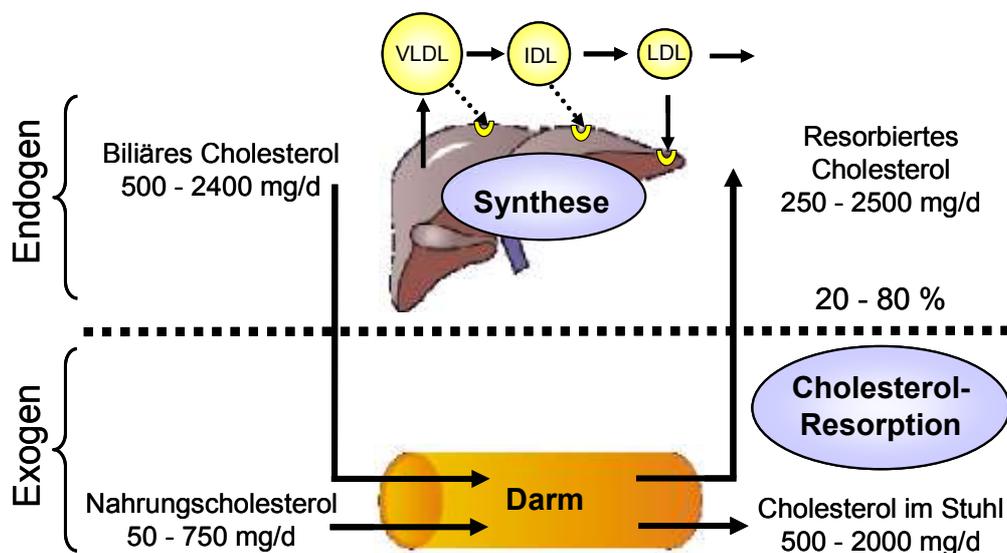


Abbildung 1.2 Intestinaler Cholesterolstoffwechsel (37, 38)

Obwohl die Phytosterole in der etwa gleichen Menge wie Cholesterol mit der Nahrung zugeführt werden, sind die Serumkonzentrationen der Phytosterole Campesterol und Sitosterol rund 500- bis 800-fach niedriger als die Cholesterolkonzentration (37). Die Serumkonzentration von Cholesterol wird bei einer in der westlichen Welt üblichen Ernährung mit 125-275 mg/dl angegeben (44); die Phytosterolkonzentration liegt hingegen üblicherweise unter 1 mg/dl (40). Diese große Konzentrationsdifferenz ist auf folgende Unterschiede im Stoffwechsel der Sterole zurückzuführen (**Tabelle 1.3**):

- a) Die Phytosterole werden in wesentlich geringerem Ausmaß resorbiert als Cholesterol (siehe Kapitel 1.2.1). Für Campesterol liegen die Resorptionsraten zwischen 9 % und 18 % und für Sitosterol zwischen 4 % und 8 % (26, 45-47).
- b) Die Phytosterole werden im Vergleich zu Cholesterol wieder schneller über die Galle ausgeschieden (48) (siehe Kapitel 1.2.3). Die Elimination verläuft dabei bei Phytosterolen und Cholesterol zeitlich gemäß dem Zwei-Kompartiment-Modell.
- c) Im Gegensatz zu Cholesterol werden Phytosterole im Körper nicht synthetisiert (48) und wahrscheinlich nicht zu Gallensäuren metabolisiert (49).

Die Serumkonzentrationen der Phytosterole werden neben Resorption und Ausscheidung auch vom Lipoproteinmetabolismus bestimmt. So weisen zum Beispiel Hypercholesterolämiepatienten mit einer höheren Anzahl an zirkulierenden Lipoproteinpartikeln auch höhere Phytosterolkonzentrationen auf als normocholesterolämische Personen, das Konzentrationsverhältnis von Phytosterolen zu Cholesterol ist jedoch in beiden Gruppen vergleichbar (37). Die Campesterol- und Sitosterolkonzentrationen im Serum werden daher häufig standardisiert, das heißt im Verhältnis zur Cholesterolkonzentration angegeben (50).

Tabelle 1.3 Stoffwechselkennndaten von Cholesterol und Phytosterolen im Vergleich

Parameter	Cholesterol	Phytosterole
Serumkonzentration ^a	125-275 mg/dl	<1 mg/dl
Zufuhr mit der Nahrung ^a	300-500 mg/d	200-400 mg/d
Resorptionsrate ^b	50 % (20-80 %)	9-18 % Campesterol 4-8 % Sitosterol
Syntheserate ^c	1,6 mg kg ⁻¹ d ⁻¹	-
Halbwertszeit α ^c	6,7 d	3,8 d Sitosterol
Halbwertszeit β ^c	53 d	13,8 d Sitosterol
Hepatische Clearance ^d	0,31 dl/h	2,11 dl/h Campesterol 4,97 dl/h Sitosterol

^a Referenzen (37, 44, 51); ^b Referenzen (12, 26, 39, 40, 45-47); ^c Referenz (48); ^d Referenz (52)

1.2.1 Die intestinale Resorption von Sterolen

Bis vor wenigen Jahren war weitgehend unklar, welcher Mechanismus dazu führt, dass Phytosterole in sehr viel geringerem Ausmaß im Darm resorbiert werden als Cholesterol. Mit der Entdeckung der ATP-Binding Cassette (ABC)-Halbtransporter ABCG5 und ABCG8 (53) sowie der Entwicklung des Cholesterolresorptionshemmers Ezetimib (54) konnten jedoch neue Einsichten in die Regulation der intestinalen Resorption und auch der biliären Ausscheidung von Cholesterol und Phytosterolen gewonnen werden.

Der gesamte Vorgang der intestinalen Resorption² von Sterolen lässt sich in eine extrazelluläre und intrazelluläre Phase einteilen. Die *extrazelluläre Phase* spielt sich im Lumen von Duodenum und proximalem Jejunum ab (55). Cholesterol- und Phytosterolester aus der Nahrung werden größtenteils im oberen Abschnitt des Dünndarms durch die Carboxylesterlipase (früher Cholesterolesterase genannt), die vom Pankreas sezerniert wird, hydrolysiert (56). Unter der Wirkung von konjugierten Gallensäuren aggregieren die Sterole und weitere amphiphile Spaltprodukte der Nahrungslipide (Mono- und Diglyzeride, Fettsäuren und Phospholipide) zu gemischten Micellen. Die Micellen dienen vor allem als Transportvehikel, die die zur Resorption bestimmten hydrophoben Substrate durch die wässrige Phase des Darminhalts und durch die sogenannte *unstirred water layer* zur Membran der Epithelzellen gelangen lassen. Dort werden die Sterole und alle weiteren Spaltprodukte in die Epithelzelle aufgenommen (28, 57). Die Gallensäuren werden erst im Ileum zu über 98 % rückresorbiert (enterohepatischer Kreislauf) (38).

Abbildung 1.3 stellt die molekularen Mechanismen in der *intrazellulären Phase* der Resorption von Cholesterol und Phytosterolen im Vergleich dar. Die Fokussierung auf das Zielprotein von Ezetimib führte dazu, dass die Arbeitsgruppen um Altmann und Davis im Jahr 2004 von der Identifikation des Proteins Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) als intestinale Steroltransporter berichteten (58, 59). NPC1L1 wird an der apikalen Seite des Enterozyten insbesondere im proximalen Jejunum exprimiert (58). Die Ergebnisse aus Versuchen mit NPC1L1-Knockout-Mäusen (58-60) und mit Zellen (61, 62) weisen darauf hin, dass Cholesterol und Phytosterole über denselben Transportmechanismus, der NPC1L1 involviert, in die intestinale Epithelzelle aufgenommen werden (59).

² In der vorliegenden Arbeit bezieht sich die Bezeichnung „Resorption“ auf den Transfer der Sterole vom Darmlumen in die Lymphe. Der Begriff „Aufnahme“ bezeichnet nur den Eintritt der Sterole in die Mucosazelle.

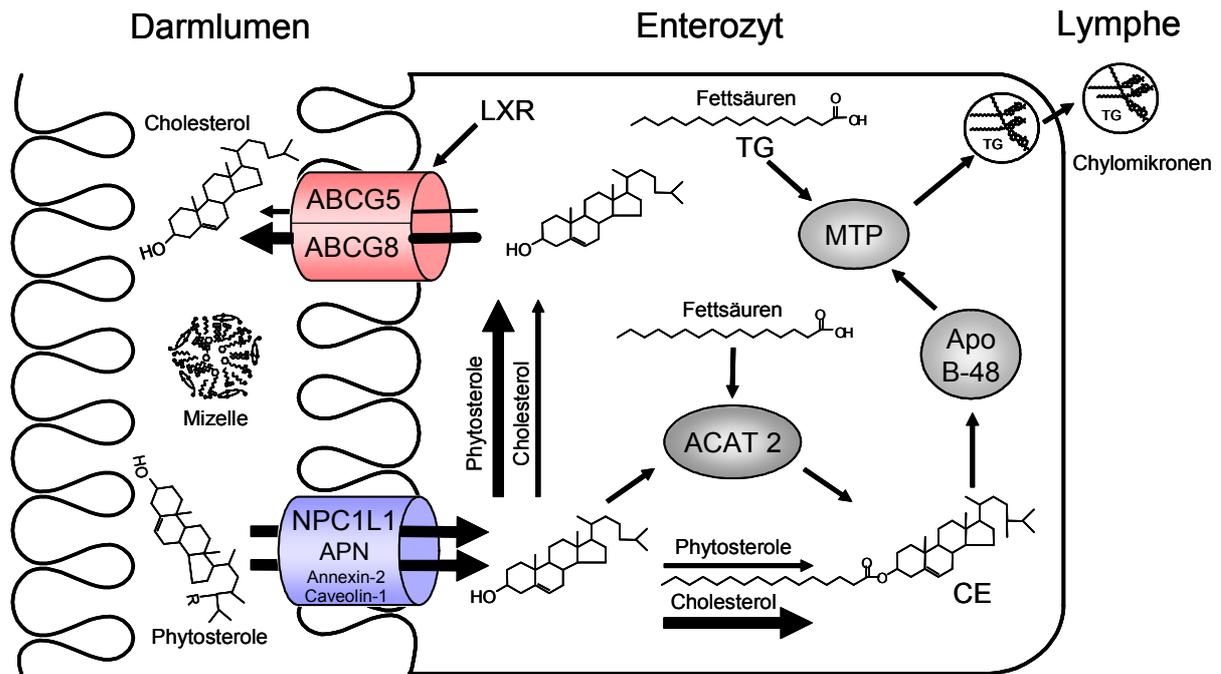


Abbildung 1.3 Molekulare Mechanismen der intestinalen Resorption von Cholesterolem und Phytosterolen. ABCG5/G8 = ATP-Binding-Cassette-Transporter G5/G8; ACAT = Acyl-Coenzyme A-Cholesterolem-Acyltransferase; APN = Aminopeptidase N; Apo = Apolipoprotein; CE = Cholesterolester; LXR = Leber-X-Rezeptor; MTP = Mikrosomales Triglyzeridtransferprotein; NPC1L1 = Niemann-Pick C1 Like 1-Protein; TG = Triglyzerid. Modifiziert nach von Bergmann *et al.*(37).

Fast zeitgleich wurde neben NPC1L1 von zwei weiteren potentiellen Angriffspunkten für Ezetimib berichtet: Einer in der Membran verankerten Aminopeptidase N (CD13) (63) und einem Annexin-2/Caveolin-1-Komplex (64). Diese Studien sowie die Tatsache, dass auch bei NPC1L1-Knockout-Mäusen noch eine geringe Cholesterolemresorption festzustellen ist (58), lassen vermuten, dass NPC1L1 Teil eines Multiproteinkomplexes ist bzw. noch andere Proteine und Mechanismen in den Prozess der Sterolaufnahme an der apikalen Seite des Enterozyten involviert sind.

Nach Aufnahme der Sterole pumpen die Halbtransporter ABCG5 und ABCG8 (auch Sterolin-1 und Sterolin-2 genannt) die unveresterten pflanzlichen Sterole bevorzugt gegenüber Cholesterolem aus dem Enterozyten zurück in das Darmlumen (37, 40, 65, 66). Nahrungscholesterolem scheint die Expression von ABCG5 und ABCG8 via den Leber-X-Rezeptor (LXR) zu aktivieren (67, 68). ABCG5 und ABCG8 werden als Heterodimer an der apikalen Seite des Enterozyten und außerdem an der kanalikulären Membran der Leberzelle exprimiert (69-71). Die zahlreichen Ergebnisse aus *in vitro*-Experimenten (72), Versuchen mit transgenen Mäusen (69, 70, 73-77) und Untersuchungen bei Phytosterolemiepatienten (53, 78, 79) lassen darauf

schließen, dass ABCG5/ABCG8 dafür verantwortlich sind, Cholesterol und bevorzugt Phytosterole sowohl aus dem Enterozyten in das Darmlumen als auch aus der Leber in die Galle zu transportieren. Hierdurch begrenzen sie die intestinale Resorption von Sterolen und fördern deren Ausscheidung aus der Leber in die Galle. Mutationen in mindestens einem der beiden Gene ABCG5 und ABCG8 sind die Ursache für die seltene Erbkrankheit Phytosterolämie (Sitosterolämie) (53, 80-82). Phytosterolämiepatienten weisen eine stark erhöhte Resorption und verminderte biliäre Ausscheidung von Phytosterolen und Cholesterol auf, was zu einer bis zu 50-fach erhöhten Phytosterolkonzentration im Serum und einer Anreicherung von Phytosterolen im Gewebe führt (48, 53, 83).

Cholesterolmoleküle, die nach der Aufnahme in den Enterozyten nicht wieder über ABCG5/ABCG8 in das Darmlumen zurück transportiert werden, sowie weiter endogen synthetisiertes Cholesterol werden am endoplasmatischen Retikulum durch die Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase 2 (ACAT 2) verestert. Die Veresterung von Cholesterol scheint ein notwendiger Schritt für den Transport des Cholesterols durch die Mucosazelle zu sein. Der ACAT 2 wird daher auch eine regulierende Funktion bei der Cholesterolresorption zugesprochen (84, 85). Bereits 1983 wurde gezeigt, dass Sitosterol kein geeignetes Substrat für die ACAT 2 darstellt, so dass eine geringere Veresterung der Phytosterole zu der niedrigeren Resorption von Phytosterolen beitragen könnte (86). Das mikrosomale Triglyzeridtransferprotein (MTP) und Apolipoprotein B₄₈ spielen eine wichtige Rolle bei der anschließenden Inkorporation von Sterolestem in die Chylomikronen bzw. bei der Exozytose der Chylomikronen in die Lymphe. Genetische Defekte in beiden Proteinen führen zu einer verminderten Cholesterolresorption (57). Mit Abgabe der Chylomikronen an die Lymphe endet die intrazelluläre Phase der Resorption.

Die intestinale Resorption von Sterolen ist damit ein komplexer Prozess, der durch mehrere Gene auf der Ebene des Enterozyten reguliert wird und genetische Faktoren scheinen die entscheidende Ursache für Schwankungen der Cholesterolresorption zwischen Individuen zu sein (87).

1.2.2 Transport der Sterole in Lymphe und Blut

Sterole können in Lymphe und Blut nur in Form von Lipoproteinen transportiert werden. In Chylomikronen „verpackt“ gelangen die resorbierten Sterolen aus dem Enterozyten über die Lymphe in den venösen Blutkreislauf. Während der Passage durch die Gewebekapillaren werden die Triglyzeride in den Chylomikronen durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert und die verbleibenden cholesterolesterreichen Chylomikronen-Remnants werden über Lipoproteinrezeptoren (LDL-Rezeptor, Apo E sensitiver Chylomikronen-Remnant-Rezeptor) in die Leber aufgenommen (*exogener Stoffwechselweg*, **Abbildung 1.4**).

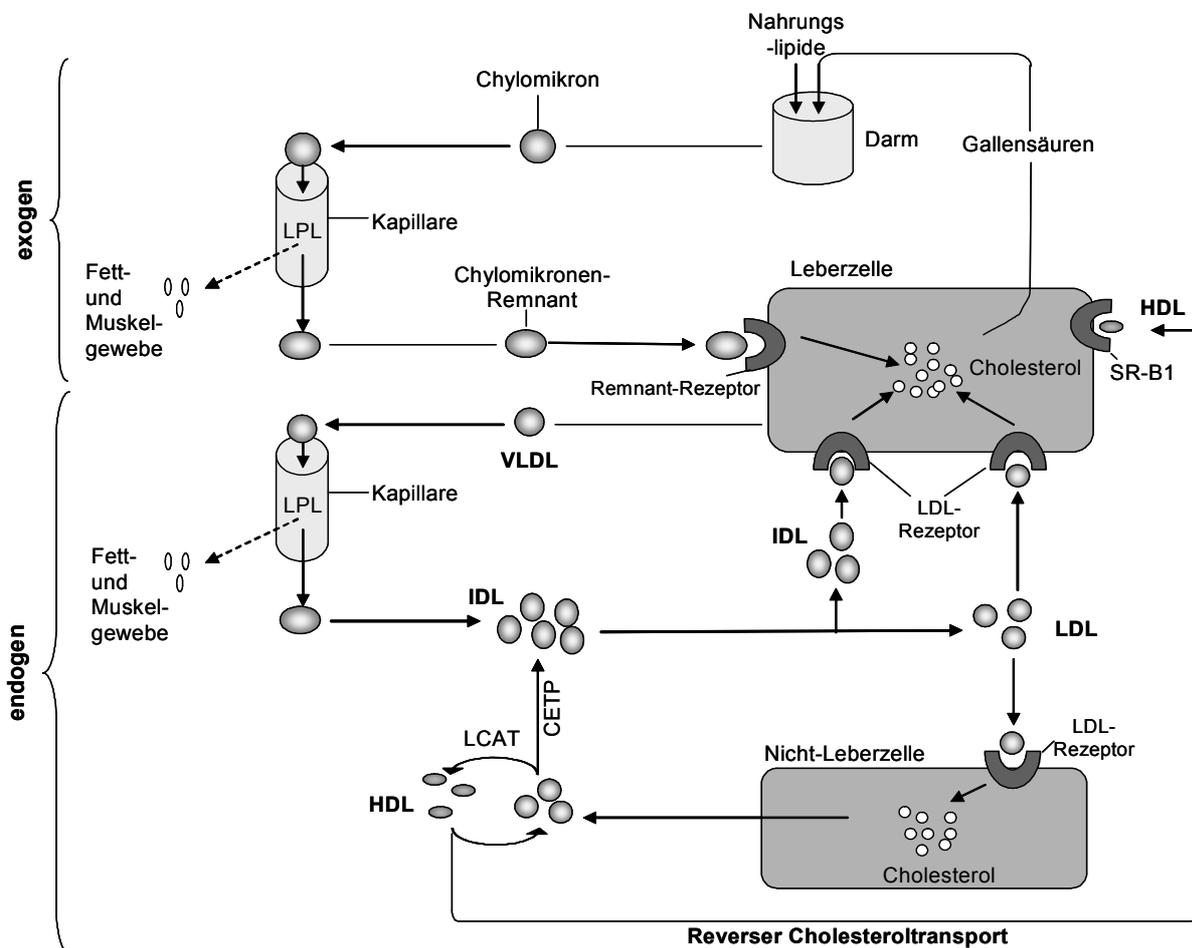


Abbildung 1.4 Cholesteroltransport im Blut modifiziert nach Mutschler *et al.* (88). HDL = High-Density-Lipoprotein; IDL = Intermediate-Density-Lipoprotein; LCAT = Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase; LDL = Low-Density-Lipoprotein; LPL = Lipoproteinlipase; SR-B1 = Scavenger-Rezeptor B1; VLDL = Very-Low-Density-Lipoprotein.

Die Leber kann das im Darm resorbierte und auch *de novo* synthetisiertes Cholesterol in Form von Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) ins Blut abgeben. Die Phytosterole werden bevorzugt mit der Galle aus der Leber ausgeschieden, können aber auch in den VLDL in die Blutzirkulation gelangen. Durch die LPL-katalysierte Hydrolyse der Triglyzeride in den VLDL entstehen über Zwischenstufen Low-Density-Lipoproteine (LDL). Rund zwei Drittel des Cholesterols im Blut liegt in den LDL-Partikeln vor – überwiegend in Form von Cholesterolestern. Die LDL transportieren das Cholesterol in die peripheren Gewebe (*endogener Stoffwechselweg*, **Abbildung 1.4**). In der Skelettmuskulatur und im Gehirn wird der Cholesterolbedarf hauptsächlich durch Eigensynthese gedeckt (42). Der Großteil der LDL (zwei Drittel) wird über die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das andere Drittel der LDL gelangt in modifizierter Form unabhängig vom LDL-Rezeptor in die Zellen (*scavenger pathway*). Benötigen Leber oder andere Gewebe Cholesterol, wird die Zahl der LDL-Rezeptoren an der Oberfläche erhöht. Ist der Cholesterolbedarf der Zellen gedeckt, wird die LDL-Rezeptorzahl gesenkt (42, 89).

High-Density-Lipoproteine (HDL) transportieren das Cholesterol aus den peripheren Geweben zur Leber, dem Ort der Ausscheidung, zurück (*reverser Cholesteroltransport*, **Abbildung 1.4**). Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase (LCAT), die das freie überschüssige Cholesterol aus den Zellen als auch aus anderen triglyzeridreichen Lipoproteinen verestert (90), und der ABCA1-Transporter, der an der Ausschleusung des Cholesterols aus den Zellen der peripheren Gewebe beteiligt ist (91-93). HDL kann an den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) der Leber binden, der die selektive Aufnahme von Cholesterolestern vermittelt (94) oder, wenn es zur Apo E-haltigen Subpopulation gehört, über den Apo E-Rezeptor aufgenommen werden (95). Außerdem erleichtert das Cholesterolestertransferprotein (CETP) im Blut die Übertragung von Cholesterolester aus HDL auf Apo B-haltige Lipoproteine wie VLDL, IDL oder LDL, die dann wiederum von der Leber aufgenommen werden oder erneut in die Peripherie gelangen (95). In den HDL lässt sich ein höheres Phytosterol/Cholesterol-Verhältnis finden als in den LDL (96). Rund zwei Drittel der Phytosterole im Serum sind verestert, wobei der Anteil von VLDL über LDL nach HDL ansteigt (96, 97). Vermutlich können die Phytosterolester nicht so leicht mittels CETP von HDL auf LDL und VLDL übertragen werden (98).

1.2.3 Sterolelimination

Die Leber ist das Organ, über das Cholesterole entweder nach Umbau zu Gallensäuren oder direkt in freier Form ausgeschieden wird. Kruit *et al.* wiesen kürzlich darauf hin, dass überschüssiges Cholesterole möglicherweise auch über den Enterozyten aus dem Blut in den Darm eliminiert wird (99). Die Gallensäuren werden über den Transporter ABCB11 aus dem Hepatozyten in die Galle gepumpt (Abbildung 1.5). Der Transport von freiem Cholesterole und Phytosterolen aus der Zelle erfolgt wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben über ABCG5 und ABCG8, die sich zu einem heterodimeren Transporter zusammenschließen (100-102). Eine Metabolisierung der Phytosterole zu Gallensäuren im Hepatozyten findet nicht statt (49), obwohl frühere Studien darauf hingewiesen haben (26). Für die biliäre Sekretion von Cholesterole über ABCG5/ABCG8 ist außerdem der MDR-2-Transporter (ABCB4) notwendig, der Phospholipide in die Galle sezerniert (100). Im Darm mischt sich das biliäre Cholesterole mit dem Cholesterole aus der Nahrung und wird in unterschiedlichen Mengen wieder rückresorbiert. Das nicht wieder resorbierte Cholesterole wird nach Metabolisierung durch Darmbakterien als Coprostanol und Coprostanon oder in freier Form mit den Faeces ausgeschieden (103). Analog zu Cholesterole wird auch ein Großteil der Phytosterole durch Darmbakterien zu Methylcoprostanol und -coprostanon (Campesterole) und Ethylcoprostanol und -coprostanon (Sitosterole) metabolisiert, bevor sie mit den Faeces ausgeschieden werden (104).

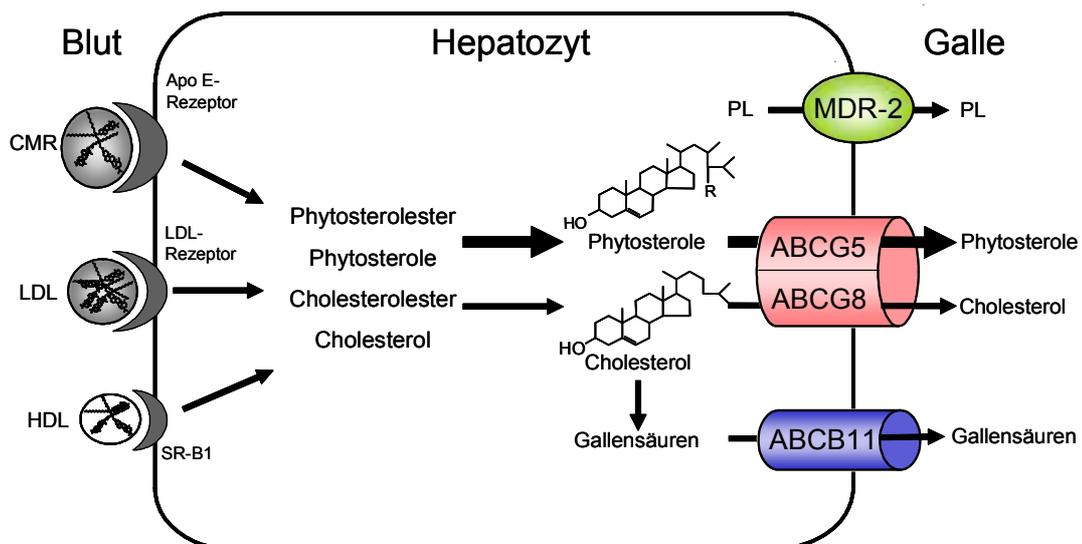


Abbildung 1.5 Zelluläre Ausscheidungswege von Cholesterole und Phytosterolen in der Leber. ABCB11 = ATP-Binding-Cassette-Transporter B11; ABCG5/G8 = ATP-Binding-Cassette-Transporter G5/G8; Apo = Apolipoprotein; CMR = Chylomikronen-Remnant; HDL = High-Density-Lipoprotein; LDL = Low-Density-Lipoprotein; PL = Phospholipid; SR-B1 = Scavenger-Rezeptor B1.

1.3 Pharmakologische Hemmung der intestinalen Sterolresorption

1.3.1 Hintergrund

Störungen im Lipidstoffwechsel, insbesondere primäre und sekundäre Formen der Hypercholesterolämie, werden mitverantwortlich gemacht für die Pathogenese der Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen wie die Koronare Herzkrankheit (KHK). Die Hypercholesterolämie im Sinne einer erhöhten LDL-Cholesterolkonzentration gilt als wichtigster Risikofaktor für die KHK (9, 105). Auch Patienten mit Phytosterolämie entwickeln – ähnlich wie Patienten mit familiärer Hypercholesterolämie – Xanthome und eine frühzeitige, häufig letal verlaufende, Atherosklerose (48, 83). Ob erhöhte Phytosterolkonzentrationen bei Nicht-Phytosterolämiepatienten einen Risikofaktor für KHK darstellen, ist momentan Gegenstand kontroverser Diskussionen und konnte in bisherigen Studien noch nicht eindeutig beantwortet werden (106-111).

Nach europäischen und US-amerikanischen Behandlungsleitlinien (112, 113) stellt daher die Senkung der LDL-Cholesterolkonzentration im Blutserum nach wie vor die wesentliche Strategie zur Reduktion des KHK-Risikos dar. Nicht-medikamentöse Therapieoptionen (Ernährungsumstellung, Gewichtsreduktion) bilden dabei immer die Grundlage der Behandlung. Wenn diese jedoch nicht ausreichend umsetzbar sind, um die für den Patienten unter Berücksichtigung seines KHK-Risikoprofils definierte LDL-Cholesterolkonzentration zu erzielen, ist der Einsatz von lipidsenkenden Medikamenten notwendig.

Aufgrund ihrer hohen Effektivität werden bei der medikamentösen Behandlung der Hypercholesterolämie am häufigsten Statine eingesetzt. Sie hemmen die HMG-CoA-Reduktase und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese und können, in Höchstdosis verabreicht, die LDL-Cholesterolkonzentration im Serum zu mehr als 50 % senken (114). Dennoch erreichen vor allem Hochrisikopatienten oft nicht die angestrebten Gesamt- und LDL-Cholesterolkonzentrationen unter einer Statinmonotherapie (115). Auch eine Steigerung der Dosis verbessert die therapeutische Wirkung der Statine nur relativ gering, erhöht aber dafür die Nebenwirkungen (116). Die gleichzeitige Gabe eines mäßig bis hoch dosierten Statins und eines Stoffes mit anderem Wirkmechanismus wie dem Cholesterolresorptionshemmer Ezetimib ist daher eine weitere Therapiestrategie, um eine größere LDL-Cholesterolsenkung zu erzielen als unter Monotherapie mit einem Statin.

1.3.2 Ezetimib

Ezetimib (Ezetrol[®], **Abbildung 1.6**) hemmt die Resorption von biliärem und mit der Nahrung zugeführtem Cholesterol. Es lagert sich an der Bürstensaummembran der Enterozyten an (117) und greift auf Zellebene vermutlich direkt am NPC1L1-Transporter an und hemmt dessen Aktivität (58, 59, 118). Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch die Hemmung der Cholesterolresorption kommt es zu einem verminderten Transport von biliärem und mit der Nahrung zugeführtem Cholesterol in die Leber. Die hepatische LDL-Rezeptoraktivität erhöht sich, wodurch vermehrt LDL-Partikel aus der Blutzirkulation in die Leber aufgenommen werden, so dass sich die LDL-Cholesterolkonzentration im Serum zwischen 17 % und 20 % vermindert (119).

In klinischen Studien senkte eine zweiwöchige Monotherapie mit Ezetimib (10 mg/d) die Cholesterolresorption um 54 % bei Hypercholesterolämiepatienten (12) und um 58 % bei Vegetariern (120). Die Hemmung der Cholesterolresorption durch Ezetimib wurde dabei von einem Anstieg der Cholesterolbiosynthese begleitet (12). Durch die gemeinsame Gabe von Ezetimib mit einem Statin wird aufgrund des dualen Wirkansatzes eine additive Wirkung erzielt und deutlich mehr Patienten erreichen ihre empfohlenen LDL-Cholesterol-Zielkonzentrationen als unter Monotherapie mit einem Statin (121-125). Untersuchungen zur direkten Wirkung von Statinen auf die Cholesterolresorption lieferten bisher widersprüchliche Ergebnisse (126-129), und es wurden bislang noch keine Daten zur Wirkung einer kombinierten Gabe von Ezetimib mit einem Statin auf die Cholesterolresorption veröffentlicht. Ezetimib senkt auch die pflanzlichen Serumsterole Campesterol und Sitosterol sowohl bei Hypercholesterolämiepatienten (12) als auch bei Phytosterolämiepatienten (130). Dies weist darauf hin, dass auch die Resorption der Phytosterole gehemmt wird (37). Eine direkte Bestimmung der Resorption von Phytosterolen bei Patienten unter Behandlung mit Ezetimib und/oder Statinen wurde bisher jedoch nicht durchgeführt.

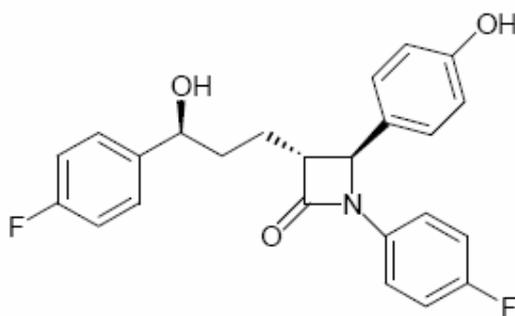


Abbildung 1.6 Strukturformel von Ezetimib (1-(4-Fluorophenyl)-3(R)-[3-(4-fluorophenyl)-3(S)-hydroxypropyl]-4(S)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinon).

1.4 Methoden zur Bestimmung der intestinalen Sterolresorption

Um die Wirkungsmechanismen von lipidsenkenden Medikamenten wie Ezetimib und Statinen besser zu verstehen, ist es von Bedeutung, auch deren direkten Einfluss auf die Sterolresorption zu ermitteln. Aber nicht nur unter der Gabe von Medikamenten ist eine Bestimmung der Sterolresorption sinnvoll. Sie kann auch dazu beitragen, Behandlungen zu optimieren, indem zum Beispiel Hypercholesterolämiepatienten mit hoher Sterolresorption identifiziert werden, bei denen die Gabe von Ezetimib eine sinnvolle Therapieoption darstellt. Auch als diagnostische Hilfe bei zum Beispiel Phytosterolämie und für die Aufklärung von Krankheitsursachen ist eine Quantifizierung der Sterolresorption von Bedeutung. Es wurden daher in den letzten Jahrzehnten mehrere Methoden entwickelt, um die intestinale Sterolresorption beim Menschen zu bestimmen (14-16).

In den 1960-80er Jahren wurden zur Ermittlung der intestinalen Cholesterolresorption vor allem Verfahren beschrieben, bei denen mit radioaktiven Isotopen markiertes Cholesterol ($[^3\text{H}]$ - oder $[^{14}\text{C}]$ -Cholesterol) als Markersubstanz zum Einsatz kam (131-138):

1. Kombinierte Sterolgleichgewichtsmethode nach Grundy und Ahrens (131),
2. Zwei-Isotopen-Methode im Plasma (*plasma dual isotope method*) nach Zilversmit (132, 134, 135)
3. Zwei-Isotopen-Methoden in den Faeces, zu denen die *single dose feeding dual isotope method* nach Borgstrom (136) und die *continuous feeding dual isotope method* nach Crouse und Grundy (137) gehören.
4. Intestinale Perfusionsmethode (138).

Mit Ausnahme der intestinalen Perfusionsmethode (138) wird bei diesen Methoden radioaktiv markiertes Cholesterol oral verabreicht und/oder intravenös injiziert und die spezifische Aktivität in Serum oder Faeces bestimmt. Grundlegend dafür ist, dass sich das markierte Molekül biologisch und chemisch analog zu dem natürlichen unmarkierten Molekül verhält (139). Aufgrund des möglichen gesundheitlichen Risikos, das auch von kleinen Strahlendosen ausgehen kann, ist die Anwendung dieser Methoden jedoch nur sehr begrenzt möglich (140).

Bosner und Ostlund *et al.* (141) führten daher 1993 Cholesterol, das mit stabilen Isotopen (^2H oder ^{13}C) markiert war, anstelle der radioaktiven Marker in die *plasma dual isotope method* nach Zilversmit ein (132, 134, 135). Diese Methode beinhaltet jedoch die intravenöse Injektion von einem der Marker und damit einen invasiven Schritt. Im selben Jahr modifizierten

auch Lütjohann *et al.* (39) die *continuous feeding dual isotope method* nach Crouse und Grundy (137), indem sie an Stelle der radioaktiven Marker mit stabilem Wasserstoff (^2H ; Deuterium; D) markiertes D_6 -Cholesterol und D_4 -Sitostanol als nicht-resorbierbaren Standard (*fecal flow marker*) einsetzten. Bei dieser Methode wird D_6 -Cholesterol gemeinsam mit D_4 -Sitostanol in einem bekannten Verhältnis über sieben Tage oral in Form einer Kapsel verabreicht. An den letzten vier Tagen der Kapseleinnahme werden Stuhlproben gesammelt, in denen die Wiederfindung von D_6 -Cholesterol und seinen Metabolisierungsprodukten D_6 -Coprostanol und D_6 -Coprostanon im Verhältnis zu D_4 -Sitostanol mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS) bestimmt wird. Aus den Daten kann dann berechnet werden, wie groß der relative Anteil des oral verabreichten D_6 -Cholesterols ist, der aus dem Stuhl „verschwunden“ und damit resorbiert worden ist. (46). Das Verfahren wurde gegenüber der Methode von Crouse und Grundy validiert (39) und in mehreren klinischen Studien erfolgreich eingesetzt (12, 46, 120, 142), unter anderem auch zur Bestimmung der Resorption von Campesterol und Sitosterol (46). Dennoch ist die Methode insgesamt recht aufwendig und erfordert ein umständliches Sammeln von Stuhlproben.

Explorative Untersuchungen in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn haben jedoch gezeigt, dass auch in den Serumproben von Studienteilnehmern, denen im Rahmen der Resorptionsbestimmung nach Lütjohann *et al.* D_6 -Cholesterol, D_6 -Campesterol und D_6 -Sitosterol oral verabreicht wurden, Spuren der deuterierten Sterole zu finden sind. Es ist bereits bekannt, dass die absoluten Serumkonzentrationen der natürlichen Phytosterole Campesterol und Sitosterol und insbesondere ihre Quotienten zur Cholesterolkonzentration positiv mit der Cholesterolresorption (bestimmt nach der Methode von Crouse und Grundy (137)) korrelieren (96, 143). Da auch die deuterierten Sterole nicht endogen synthetisiert werden, ist davon auszugehen, dass deren Serumkonzentrationen ebenso Rückschlüsse auf die Resorption der Sterole zulassen. Die Bestimmung der oral verabreichten deuterierten Sterole im Serum könnte daher ein einfacheres Verfahren zur Bestimmung der Sterolresorption darstellen, bei dem auf das Sammeln von Stuhlproben verzichtet werden kann. Eine Quantifizierung der deuterierten Sterole in den Serumproben wurde jedoch bisher nicht durchgeführt. Ein Grund dafür ist, dass die Sensitivität der im Labor für Klinische Pharmakologie etablierten GC/MS-Methode zur Analyse von Serumsterolen/-stanolen (144) nicht ausreichend ist, um die sehr niedrigen Konzentrationen der deuterierten Sterole bei gleichzeitiger Anwesenheit der hohen Konzentration an natürlichem Cholesterol im Serum zu bestimmen.

1.5 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen einer placebokontrollierten klinischen Studie durchgeführt, in der die Wirkung von Ezetimib und Simvastatin jeweils als Mono- sowie als Kombinationstherapie auf die Sterolresorption und Cholesterolsynthese von männlichen Patienten mit leichter Hypercholesterolämie untersucht wurde. Um die Resorption von Cholesterol, Campesterol und Sitosterol nach der *continuous feeding dual stable isotope method* von Lütjohann *et al.* (39) über Stuhlproben zu bestimmen, nahmen die Studienteilnehmer die deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol gemeinsam mit D₄-Sitostanol als *fecal flow marker* oral zu sich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in den Serumproben der Studienteilnehmer, die am Ende jeder Behandlungsperiode gewonnen wurden, die resorbierten deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol und die entsprechend natürlich vorkommenden Sterole Cholesterol, Campesterol und Sitosterol zu quantifizieren. Die dafür notwendigen GC/MS-Methoden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgebaut und validiert. Die Analyse der Sterole in den Seren sollte zur Klärung folgender Fragen beitragen:

- Besteht ein Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole und den entsprechenden natürlich vorkommenden Sterolen?
- Korrelieren die (absoluten und cholesterol-standardisierten) Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol und der natürlichen Phytosterole Campesterol und Sitosterol mit der Cholesterolresorption (bestimmt nach Lütjohann *et al.*) und der Cholesterolsynthese?
- Wie groß ist die Änderung der (absoluten und cholesterol-standardisierten) Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol und der natürlichen Phytosterole Campesterol und Sitosterol unter der Behandlung mit Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib gegenüber der Behandlung mit Placebo? Besteht ein Zusammenhang zwischen den Änderungen der Serumsterolkonzentrationen und den Änderungen der Cholesterolresorption?
- Korrelieren die Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole untereinander und reflektiert der Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole den Unterschied zwischen den Resorptionsraten der Sterole?

2 KLINISCHE STUDIE

Die klinische Studie, aus der die in der vorliegenden Arbeit analysierten Serumproben stammen, wurde im Zeitraum von Juli 2003 bis April 2004 in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. K. von Bergmann und mit finanzieller Unterstützung von MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland durchgeführt. Die Studie war konzipiert worden, um den Einfluss von Simvastatin und Ezetimib – in Kombination und jeweils allein verabreicht – auf die Cholesterolresorption und Cholesterolbiosynthese bei Männern mit Hypercholesterolämie zu untersuchen. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol jeweils simultan mit den entsprechenden natürlichen Sterolen Cholesterol, Campesterol und Sitosterol. Um den Zusammenhang zwischen den Serumsterolkonzentrationen und der Cholesterolresorption und -synthese zu beurteilen, wurden die erhobenen Daten zur Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese (nicht veröffentlichte Daten) in die vorliegende Arbeit mit einbezogen.

2.1 Studiendesign

Die klinische Studie wurde nach einem randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten, vierphasigen Crossover-Design mit männlichen Patienten mit leichter bis moderater Hypercholesterolämie durchgeführt.

Nach einer zweiwöchigen Placebo-Run-in-Phase, wurde jeder Studienteilnehmer per Zufallsverfahren einer von vier Behandlungssequenzen zugeteilt. Die Behandlungssequenz legte fest, in welcher Reihenfolge in den anschließenden vier siebenwöchigen Behandlungsperioden die Medikamente Ezetimib (10 mg/d), Simvastatin (20 mg/d), Ezetimib plus Simvastatin (10/20 mg/d) und ein Placebopräparat eingenommen wurden (**Abbildung 2.1**). In der letzten Woche jeder Behandlungsperiode nahmen die Studienteilnehmer dreimal täglich mit den Mahlzeiten eine Markerkapsel ein. Diese bestand aus einer Gelatinekapsel, die ein Gemisch aus je 3,26 mg 26,26,26,27,27,27-²H₆-Cholesterol (D₆-Cholesterol), 1,27 mg 2,2,3,4,4,6-²H₆-Campesterol (D₆-Campesterol), 1,48 mg 2,2,3,4,4,6-²H₆-Sitosterol (D₆-Sitosterol) und 2,67 mg 5,6,22,23-²H₄-Sitostanol (D₄-Sitostanol) gelöst in 400 µl Pflanzenöl (Livio[®], Unilever Bestfoods Deutschland) enthielt. An den letzten vier Tagen der Kapseleinnahme sammelten die Studienteilnehmer täglich eine Stuhlprobe zur Bestimmung der Sterolresorption und Cholesterol-

synthese. Am Ende jeder Behandlungsperiode wurde von jedem Studienteilnehmer morgens im nüchternen Zustand eine Blutprobe entnommen und das Serum für die Quantifizierung der deuterierten und natürlichen Sterole gewonnen. Die Seren und Stuhlproben wurden bei -20°C bis zur Analyse gelagert. Die Probanden wurden dazu angehalten, während des Studienverlaufs ihre Ernährungsgewohnheiten beizubehalten. In der Placebo-Run-in-Phase und in der jeweils letzten Woche einer Behandlungsperiode führten die Probanden ein Sieben-Tage-Ernährungsprotokoll, in dem sie Art und Menge der verzehrten Nahrungsmittel festhielten und worüber die durchschnittliche tägliche Cholesterolzufuhr ermittelt wurde.

Das Studienprotokoll war von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn positiv beraten worden und alle Teilnehmer hatten nach Aufklärung über Ziel und Ablauf der Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme erklärt.

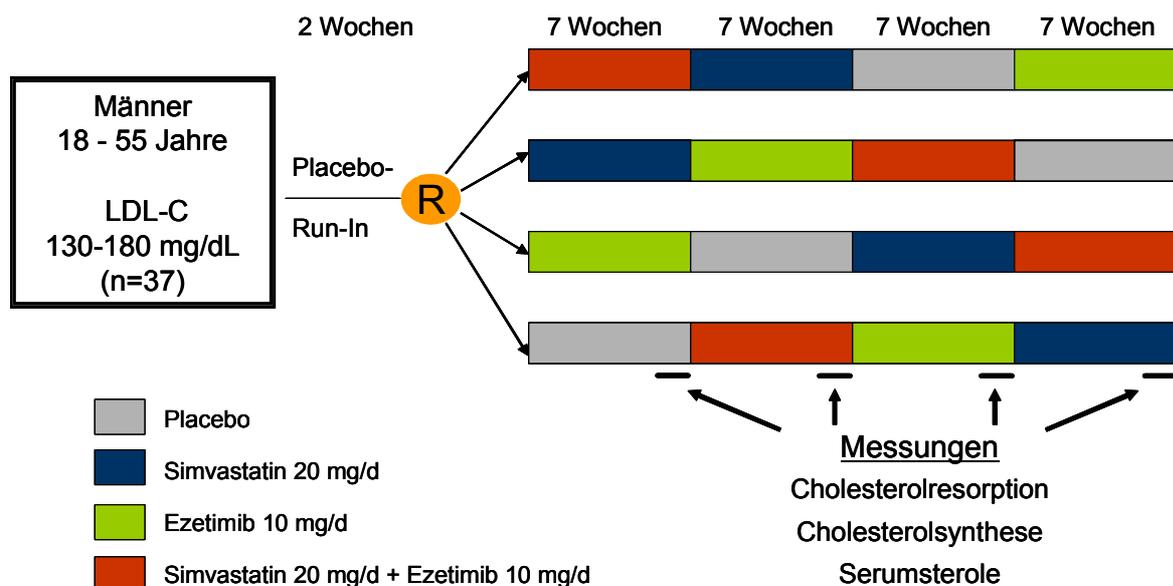


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des Studiendesigns. Die klinische Studie wurde nach einem randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten, vierphasigen Crossover-Design durchgeführt. Ausführliche Erklärungen finden sich im Text. R = Randomisierung.

2.2 Studienteilnehmer

Von den 41 männlichen Probanden, die auf Basis der Ein- und Ausschlusskriterien (**Tabelle 2.1**) ursprünglich in die Studie aufgenommen worden waren, wurden die Serumproben von insgesamt 37 Probanden (insgesamt 148 Serumproben) im Rahmen der vorliegenden Arbeit

analysiert. Ausschlussgründe waren, dass ein Proband (AN 232) aufgrund der Einnahme unerlaubter Begleitmedikation die Studie vorzeitig beenden musste. Bei zwei weiteren Probanden (AN 204 und AN 217) wurde während der Studie eine geringe Compliance festgestellt (fehlende Stuhlproben und nicht eingenommene Markerkapseln) und bei einem weiteren Probanden (AN 235) war das Volumen der Serumprobe nicht mehr ausreichend ($<800 \mu\text{l}$) für die Bestimmung der deuterierten Sterole. Die 37 Studienteilnehmer waren im Mittel 40 ± 8 Jahre (Spannbreite 23 bis 55 Jahre) und hatten einen Body-Mass-Index (BMI)³ von $25,3 \pm 2,5 \text{ kg/m}^2$ (Spannbreite 21,0 bis $30,4 \text{ kg/m}^2$) auf.

Tabelle 2.1 Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der klinischen Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Männer im Alter von 18 bis 55 Jahren • Body-Mass-Index (BMI) zwischen 18 und 31 • LDL-C-Serumkonzentration ≥ 130 und $\leq 180 \text{ mg/dl}$ • Triglyzeridkonzentrationen $\leq 250 \text{ mg/dl}$ • mindestens eine aber nicht mehr als durchschnittlich zwei Stuhlentleerungen am Tag ohne den Gebrauch von Laxantien • ansonsten allgemein guter Gesundheitszustand beurteilt anhand von Anamnese, körperlicher Untersuchung und Laborbefunden <p>nach der Placebo-Run-in-Phase:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cholesterolzufuhr im Bereich von 200-500 mg/d und keine übermäßige Zufuhr von ballaststoffreichen Lebensmitteln basierend auf der Auswertung des Sieben-Tage-Ernährungsprotokolls aus der Placebo-Run-in-Phase • Gute Medikationscompliance (höchstens eine versäumte Einnahme einer Placebo-Tablette) 	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus und andere endokrinologische Erkrankungen sowie hoher Alkoholkonsum in der Krankengeschichte • Bluthochdruck • Gestörte Nierenfunktion • Erkrankungen der Leber • Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes • Malignes Tumorleiden in den letzten fünf Jahren • Psychische Beeinträchtigungen • Überempfindlichkeit gegenüber Statinen • Behandlung mit einem anderen Medikament in klinischer Prüfung in den vergangenen 30 Tagen • Einnahme lipidsenkender Medikamente in den letzten 8 Wochen vor und während der Studie • Einnahme von Produkten mit Zusätzen von Phytosterolen bzw. Phytosteranolen 2 Wochen vor und während der Studie • Einnahme von CYP3A4-Inhibitoren während der Studie. Verzehr von mehr als 250 ml Grapefruitsaft pro Tag während der Studie. • Behandlung mit Corticosteroiden während der Studie

BMI = Body-Mass-Index; CYP3A4 = Cytochrom P450 der Isoform 3A4; LDL-C = Low-Density-Lipoprotein-Cholesterol

³ BMI = Gewicht [kg]/Größe [m]²

3 MATERIAL

3.1 Chemikalien, Lösungen und Reagenzien

Standards

- 5 α -Cholestan (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Cholesterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 26,26,26,27,27,27-D₆-Cholesterol (CDN Isotopes, Pointe-Claire, Quebec, Kanada)
- Epicoprostanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- 5,6,22,23-D₄-Sitostanol (Medical Isotopes, Pelham, USA)
- Sitosterol/Campesterol (55%:45%, w/w) (Sugaris GmbH, Münster, Deutschland)
- 2,2,3,4,4,6-D₆-Sitosterol/2,2,3,4,4,6-D₆-Campesterol (55%:45%, w/w) (Sugaris GmbH, Münster, Deutschland)

Chemikalien und Lösemittel

- Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Acetonitril (LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland)
- Cyclohexan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- n-Dekan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland)
- Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol (Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, Großbritannien)
- Hexamethyldisilazan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Pyridin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Trimethylchlorosilan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Aqua bidest.

Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A.

Lösungen und Reagenzien

- *IN Natriumhydroxidlösung in 90% Ethanol*: 8 g Natriumhydroxid-Plätzchen wurden unter Kühlung in 20 ml Aqua bidest. gelöst und mit 180 ml Ethanol versetzt. Die Lösung wurde bei +4°C im Kühlschrank gelagert.
- *Derivatisierungsreagenz (Trimethylsilylierungs (TMS)-Reagenz)*: Pyridin, Hexamethyldisilazan, Trimethylchlorosilan wurden im Verhältnis 9:3:1 (v/v) gemischt. Das Reagenz wurde bei Zimmertemperatur in einer Glasflasche mit Schraubverschluss und Dichtung gelagert, um zu verhindern, dass Feuchtigkeit eindringt.
- *Isotonische Kochsalzlösung* (Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland)

3.2 Geräte und Labormaterialien für die Serumaufbereitung

3.2.1 Geräte

- Analysenwaage Sartorius MC-5 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Heizblock, temperaturkontrolliert, mit Stickstoffbegasung
- Heizplatte, temperaturkontrolliert
- Mixer
- Multipipette Plus[®] (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipetten Reference[®] für 10-100 µl und 100-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Schüttelwasserbad, temperaturkontrolliert (Köttermann GmbH, Uetze, Deutschland)
- Verschließzange für Bördelkappen
- Vortex-Mischer Reax 2000 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland)
- Zentrifuge Typ Varifuge 3.0R oder Multifuge 4KR (beide Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)

3.2.2 Labormaterialien

- Glasvials für GC, 11,6 × 32 mm, mit Bördelkappen aus Aluminium und Silikon/PTFE-Septum (VWR International, Leuven, Belgien) mit passenden Glaseinsätzen (300 µl, CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Deutschland)
- Glasvials für HPLC, 8 × 40 mm, mit Schnappverschluss aus Polyethylen (Waters, Milford, MA, USA)
- Latexhandschuhe Typ SafeSkin SatinPlus[™] (Kimberly-Clark, Rosswell, GA, USA)
- Parafilm (American National Can, Greenwich, Großbritannien)
- Pasteurpipetten aus Glas, 150 mm und 225 mm (Brand GmbH, Deutschland)
- Pipettenaufsätze Combi-Tip[®] für Multipipette[®], 1 ml, 5 ml und 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen für variable Pipetten, 10-100 µl und 100-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen aus Glas Typ SCHOTT Duran[®] mit Spitzboden, 16 × 100 mm (Schott Glaswerke AG, Mainz, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen aus Glas Typ SCHOTT Fiolax[®], 16 × 160 mm (Schott Glaswerke AG, Mainz, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen aus Glas, 16 × 100 mm (Scherf Präzision Europa GmbH, Meiningen, Deutschland) mit Schraubdeckel und Dichtscheibe aus Teflon (Labomedic GmbH, Bonn, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat mit Schnappverschluss, 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

3.3 Analyseinstrumente

3.3.1 GC/FID

GC: Hewlett-Packard (HP) 6890 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)
Injektor: HP 7683 mit 10 µl-Spritze
Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)
Software: HP GC ChemStation, Version 2.1.1.0

3.3.2 GC/MS

GC/MS 1

GC: Hewlett-Packard (HP) 6890 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)
Autosampler/Injektor: HP 7683 mit 10 µl-Spritze
Detektor: Quadrupol-Massenspektrometer HP 5973 mit EI-Ionenquelle
Software: HP Enhanced ChemStation Software, Version A.03.00

GC/MS 2

GC: Hewlett-Packard (HP) 5890 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)
Injektor: HP 7683 mit 10 µl-Spritze
Detektor: Quadrupol-Massenspektrometer HP 5973 mit EI-Ionenquelle
Software: HP ChemStation G1701BA, Version B.01.00

3.3.3 HPLC

HPLC: Waters HPLC-Anlage (Waters, Milford, MA, USA) bestehend aus: Kontrolleinheit 600S, Pumpe 616, Autosampler/Injektor 717 m und Fraktionssammler.
Um ein größeres Probenvolumen injizieren zu können (bis maximal 2 ml), wurde eine zusätzliche Probenschleife (sog. *Auxiliary Loop*) und die zugehörige Spritze mit einem größeren Fassungsvermögen in den HPLC-Injektor eingebaut.

Säulenofen: CTO-6A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Detektor: Photodiode-Array-Detektor 996 (Waters, Milford, MA, USA)
Software: Waters Millennium™ 2010/2020 Chromatography Manager, Version 2.1

3.4 Standard- und Kalibrierlösungen

Zur Herstellung von Stammlösungen wurden 1-100 mg der Festsubstanzen mit der Analysenwaage eingewogen und in Cyclohexan gelöst, so dass die Konzentration in den Stammlösungen 1-10 mg/ml betrug. Aus den Stammlösungen wurden die Standardlösungen und Kalibrierlösungen hergestellt, indem für jede Lösung ein entsprechendes Aliquot der Stammlösung entnommen und mit Cyclohexan verdünnt wurde. Die genaue Konzentration der einzelnen Sterole in den Lösungen wurde mittels GC/FID (Kapitel 4.2) verifiziert. Die Konzentrationen der Sterole in den verwendeten Lösungen werden an den entsprechenden Stellen im Text angegeben. Die Lösungen wurden luftdicht verschlossen in Glaskolben mit Glasstopfen bzw. Glasvials mit Schraubverschluss bei +4°C aufbewahrt.

3.5 Poolseren

Von acht bis zehn gesunden weiblichen und männlichen Freiwilligen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen (Serum-Monovette[®], Fa. Sarstedt). Die durch Zentrifugation (10 min, 4000 U/min) gewonnenen Seren wurden jeweils gepoolt. *Poolserum 1* wurde zur Erstellung von Kalibriergeraden für Campesterol und Sitosterol (Kapitel 4.1.6.3) verwendet. *Poolserum 2* wurde für die Herstellung von Validierungsproben verwendet (Kapitel 4.1.6.4). Die Konzentrationen der natürlichen Sterole Cholesterol, Campesterol und Sitosterol in den Poolseren wurden mittels GC/FID (Kapitel 4.2) bestimmt (**Tabelle 3.1**). Zur Herstellung eines *Kontrollserums* wurde von allen Seren der Studienteilnehmer jeweils ein Aliquot entnommen und gepoolt. Dieses Kontrollserum enthielt neben den natürlichen Sterolen somit auch die deuterierten Sterole in den im Durchschnitt zu erwartenden Konzentrationen. Das Kontrollserum wurde zu Tests während der Methodenentwicklungen (Kapitel 4.1.3.2) sowie zur Qualitätskontrolle eingesetzt (Kapitel 4.1.6.5). Die Seren wurden in Aliquoten von 750 µl – das Kontrollserum zusätzlich in Aliquoten von 50 µl – in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbonat mit Schnappverschluss (1,5 ml) bei –20°C gelagert.

Tabelle 3.1 Konzentration der natürlichen Sterole in Poolseren und Kontrollserum

Analyt	Poolserum 1	Poolserum 2
Cholesterol (mg/dl)	223	200
Campesterol (mg/dl)	0,462	0,517
Sitosterol (mg/dl)	0,326	0,345

4 METHODEN

4.1 Bestimmung der deuterierten und natürlichen Sterole im Serum

Die analytischen Methoden zur Quantifizierung der sechsfach deuterierten Serumsterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol und den entsprechenden unmarkierten Sterolen Cholesterol, Campesterol und Sitosterol in den Studienseren (insgesamt 148) wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Es erfolgte zunächst eine theoretische Abschätzung der Sterolkonzentrationen in den Serumproben der Studienteilnehmer.

4.1.1 Theoretische Abschätzung der Sterolkonzentrationen in den Serumproben

Die Abschätzung der Sterolkonzentrationen wurde durchgeführt, um die Aufarbeitung der Serumproben so auszurichten, dass die für die GC/MS-Analyse notwendigen Substanzmengen auf die Säule gelangten und um einen Anhaltspunkt für die Festlegung der Arbeitsbereiche der Kalibriergeraden zu haben.

In der placebo-kontrollierten klinische Studie von Sudhop *et al.* aus dem Jahr 2002 wurde bereits die Wirkung einer alleinigen Gabe von Ezetimib auf die Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese sowie auf die Serumkonzentration von Cholesterol, Campesterol und Sitosterol untersucht (12). Das Probandenkollektiv bestand wie in der vorliegenden Arbeit aus männlichen Patienten mit leichter bis moderater Hypercholesterolämie. Die Ergebnisse dieser Studie dienen daher als Grundlage für die Abschätzung der Konzentrationen der deuterierten und natürlichen Sterole in den in der vorliegenden Arbeit zu analysierenden Serumproben.

Mittleren unter Placebo zu erwartenden Konzentrationen

Es wurde damit gerechnet, dass die Studienteilnehmer aus der vorliegenden klinischen Studie, wie in der früheren klinischen Studie, unter Placebo Serumkonzentrationen von 220 mg/dl für Cholesterol, 0,31 mg/dl für Sitosterol und 0,44 mg/dl für Campesterol und eine durchschnittliche Cholesterolzufuhr von 350 mg/d und aufweisen würden. Nach Literaturangaben liegt die zugeführte Menge an Phytosterolen in einer vergleichbaren Größenordnung wie für Cholesterol und enthält im Schnitt 65 % Sitosterol und 30 % Campesterol (27). Damit war davon auszugehen, dass die Studienteilnehmer durchschnittlich 105 mg/d Campesterol und 228 mg/d Sitosterol mit der Nahrung zugeführt hatten. In Form der Markerkapsel nahmen die Studienteilnehmer täglich insgesamt 3,82 mg D₆-Campesterol und 4,44 mg D₆-Sitosterol zu sich. Das

Verhältnis von Zufuhr und Serumkonzentration bei den unmarkierten Phytosterolen wurde auf die deuterierten Phytosterole übertragen. Daraus ergab sich eine im Mittel zu erwartende Serumkonzentration von 16 µg/dl für D₆-Campesterol und 5 µg/dl für D₆-Sitosterol unter Placebo. Die Berechnung der zu erwartenden D₆-Cholesterolkonzentration erfolgte ausgehend von der mittleren erwarteten D₆-Sitosterolkonzentration. Es wurde berücksichtigt, dass die D₆-Cholesterolzufuhr mit der Markerkapsel mit 9,7 mg/d um einen Faktor 2,2 höher als die D₆-Sitosterolzufuhr lag und angenommen, dass – analog zu den natürlichen Sterolen – für D₆-Cholesterol die Resorption um einen Faktor 9 (37) und die Halbwertszeit (HWZ) um einen Faktor 1,7 (48) höher liegt als für D₆-Sitosterol. Darauf basierend wurde für die Placebophase eine zu erwartende mittlere D₆-Cholesterolkonzentration von 213 µg/dl im Serum ermittelt. Die mittleren geschätzten Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole unter Placebo lagen damit rund einen Faktor 1000 (D₆-Cholesterol), 14000 (D₆-Campesterol) und 37000 (D₆-Sitosterol) niedriger als die im Mittel unter Placebo erwartete Cholesterolkonzentration (220 mg/dl).

Minimal und maximal zu erwartende Konzentrationen in den Serumproben

Die niedrigsten Konzentrationen für die deuterierten Sterole wurden unter der Mono- und Kombinationstherapie mit Ezetimib erwartet. Aufgrund früherer Studienergebnisse mit natürlichen Phytosterolen (12) wurde angenommen, dass Ezetimib die deuterierten Sterole schätzungsweise um rund -50 % gegenüber Placebo senken wird und der inter-individuelle Variationskoeffizient unter Ezetimib bei 40 % liegt. Da sich bei einer Normalverteilung 96 % aller Fälle im Bereich von plus/minus zwei Standardabweichungen des Mittelwertes befinden, wurde als die minimal zu erwartende Konzentration die mittlere Konzentration unter Ezetimib minus zwei Standardabweichungen angenommen. Diese betrug für D₆-Campesterol 1,3 µg/dl, für D₆-Sitosterol 0,48 µg/dl und für D₆-Cholesterol 17 µg/dl. Analog wurde als maximal zu erwartende Konzentration für die deuterierten Sterole der Wert, der zwei Standardabweichungen über der mittleren Placebo-Konzentration lag, errechnet (**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1 Die geschätzten minimal und maximal zu erwartenden Konzentrationen der deuterierten Sterole in den Studienserum

Serumsterol	Minimum	Maximum
D ₆ -Cholesterol (µg/dl)	17	281
D ₆ -Campesterol (µg/dl)	1,3	21,1
D ₆ -Sitosterol (µg/dl)	0,48	7,99

4.1.2 Methodischer Ansatz

Zur Analytik der deuterierten und natürlichen Sterole stand ein Gaschromatograph mit einem gekoppelten Quadrupol-Massenspektrometer (GC/MS) zur Verfügung. Ausgangsbasis für den Aufbau der Methoden stellte eine von Prange (144) beschriebene und im analytischen Labor der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn etablierte GC/MS-Methode zur Analyse natürlicher Phytosterole und Phytostanole im Serum dar. Mit dieser Methode können unter Einsatz von 200 µl Serum, 3 µl Injektionsvolumen am GC und Epicoprostanol als internem Standard Campesterol und Sitosterol bis zu einer Nachweisgrenze von 0,44 µg/dl (13 pg) bzw. 1,19 µg/dl (36 pg) quantifiziert werden. Die Aufbereitung der Serumproben für die GC/MS-Analyse geht dabei auf eine Methode von Miettinen *et al.* (104) zurück und umfasst eine alkalische Hydrolyse, um die Sterole aus den Lipoproteinen und Esterbindungen frei zu setzen, die Extraktion der Sterole aus der Reaktionslösung mit Cyclohexan und eine Derivatisierung der Sterole zu leichter flüchtigen Trimethylsilylsterolen, um die GC-Analyse zu verbessern. Analog zur Ausgangsmethode wurde in der vorliegenden Arbeit für die gaschromatographische Trennung eine leicht polare 30 m-DB-XLB Kapillarsäule verwendet, bei der sich die stationäre Phase als dünner Flüssigkeitsfilm (0,25 µm) an der Innenseite der Kapillarwand befindet. Die Kapazität der Kapillarsäule ist auf absolute Substanzmengen im Bereich von ca. 100 ng/Analyt und Injektionsvolumina zwischen üblicherweise 1 und 3 µl begrenzt (145). Für GC/MS-Anwendungen im Selective Ion Monitoring (SIM)-Modus liegt die typische Nachweisgrenze bei 10 pg (146). Unter Berücksichtigung von Säulenkapazität und Nachweisgrenze lassen sich demnach Analyten bis zu einem Konzentrationsunterschied von ca. einem Faktor 10^4 gleichzeitig analysieren. Wegen der großen zu erwartenden Konzentrationsunterschiede zwischen den deuterierten Phytosterolen und dem natürlichem Cholesterol in den Serumproben (siehe vorheriges Kapitel 4.1.1) wurde die Bestimmung der deuterierten und natürlichen Phytosterole daher getrennt von der Bestimmung des deuterierten und natürlichen Cholesterols durchgeführt.

4.1.3 Bestimmung der deuterierten und natürlichen Phytosterole im Serum

Aufgrund der sehr niedrigen D₆-Campesterol- und D₆-Sitosterolkonzentrationen in den Serumproben mussten die Phytosterole für die GC/MS-Analyse aufkonzentriert werden. Da bei einer Anreicherung aller Sterole im Serum der vergleichsweise hohe Anteil an natürlichem Cholesterol die GC/MS-Analyse gestört hätte, wurden die deuterierten und natürlichen Phytosterole zunächst aus einem möglichst großen Serumvolumen mittels präparativer HPLC angereichert und dabei vom Cholesterol und anderen Serumbestandteilen abgetrennt. Das in den Gaschromatographen injizierte Probenvolumen enthielt eine insgesamt fünffach höhere Menge im Vergleich zur Ausgangsmethode (**Abbildung 4.1**). In den folgenden Kapiteln wird der Ablauf der Analyse beschrieben.

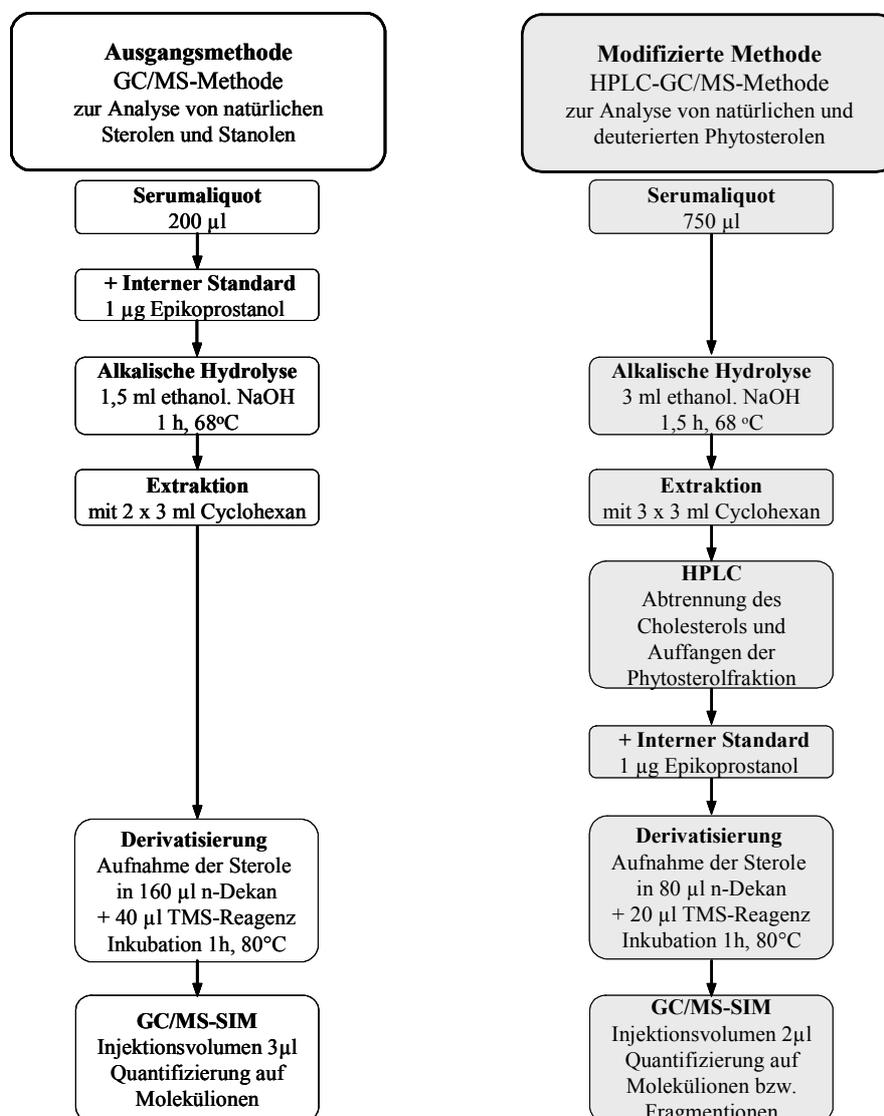


Abbildung 4.1 Schematischer Ablauf der Bestimmung von deuterierten und natürlichen Phytosterolen (rechtes Flussdiagramm) im Serum im Vergleich zu der Ausgangsmethode nach Prange (144) (linkes Flussdiagramm).

4.1.3.1 *Alkalische Hydrolyse und Extraktion*

Vorraussetzung für eine quantitative und reproduzierbare Fraktionierung von Serumsterolen mittels HPLC ist das Vorliegen der Zielsubstanzen in unveresterter Form in einem proteinfreien Medium. Letzteres ist erforderlich, um ein allzu frühes Nachlassen der Trennleistung der HPLC-Säule zu vermeiden. Der präparativen HPLC wurden daher eine alkalische Hydrolyse und Extraktion der Sterole vorgeschaltet.

- 750 µl Serum wurden in ein Zentrifugenröhrchen (16 × 100 mm) mit Schraubverschluss pipettiert.
- Für die alkalische Hydrolyse wurden der Probe 3 ml 1N ethanolischer (90 %) Natriumhydroxidlösung zugegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde fest verschlossen, kurz geschüttelt und für 1,5 h in ein Schüttelwasserbad mit einer Temperatur von 68°C gestellt.
- Die Probe wurde anschließend mit 500 µl Aqua bidest. und 3 ml Cyclohexan versetzt. Das Zentrifugenröhrchen wurde wieder fest verschlossen, 1 min geschüttelt und anschließend 10 min bei 2000 U/min und 18°C zentrifugiert. Danach wurde die obere hydrophobe Cyclohexanphase mit den Sterolen in ein Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (16 × 100 mm) überführt. Das Cyclohexan wurde direkt unter Stickstoffbegasung in einem Heizblock bei 65°C abgedampft. Der Extraktionsvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die wässrige Phase wurde danach verworfen.
- Die Sterole wurden nach der Extraktion und Abdampfen des Cyclohexans in Isopropanol aufgenommen. Ausführliche Versuche mit verschiedenen Mischungsverhältnissen und Volumina erbrachten ein optimales Ergebnis der anschließenden Fraktionierung am HPLC, wenn der Rückstand der eingedampften Cyclohexanphase zunächst in 400 µl Isopropanol und dann in 200 µl Laufmittel (Methanol/Acetonitril, 80:20, v/v) gelöst wurde. Die Volumina wurden nacheinander mit einer Pasteurpipette in ein HPLC-Vial überführt.
- Das HPLC-Vial wurde mit einer Polyethylenkappe verschlossen. Durch leichtes Klopfen an die Außenwand wurde die Probe im HPLC-Vial gemischt, um dann komplett in das HPLC-System injiziert zu werden. Das leere Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden wurde mit Parafilm verschlossen aufbewahrt, um nach der HPLC-Trennung die Phytosterolfraction darin weiter aufzuarbeiten.

Anmerkungen: Die Verwendung von Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden hat den Vorteil, dass sich kleine Volumina nahezu verlustfrei daraus entnehmen lassen und die Sterole so vollständig in das HPLC-Vial überführt werden konnten. Isopropanol, in dem die Sterole aufgenommen wurden, fungierte als Lösevermittler (147). Es ist polar genug, um sich mit dem verwendeten HPLC-Laufmittel (Methanol/Acetonitril, 80:20, v/v) zu mischen, löst aber dennoch sehr gut Substanzen mit geringer Polarität wie Sterole.

4.1.3.2 Abtrennung des Cholesterols mittels präparativer HPLC

Analysebedingungen

Für die Fraktionierung des Sterolextraktes mittels präparativer HPLC erwiesen sich die folgenden Analysebedingungen als geeignet:

HPLC-System:	siehe Kapitel 3.3.3
Autosampler/Injektor:	Injektionsvolumen: 600 μ l
Säule:	Reversed Phase Supelcosil LC-18 TM (Supelco) Länge: 25 cm Durchmesser: 10 mm Korngröße: 5 μ m
Laufmittel:	Methanol-Acetonitril (80:20, v/v) mit Helium entgast Fluss: 3 ml/min Druck: ca. 750 psi
Säulenofen:	40 °C
PDA-Detektor:	Detektionswellenlänge 205 nm

Festlegung der Schnittzeiten für die Phytosterolfraktion

Die Analyse von Sterolstandardlösungen mittels HPLC ergab eine Retentionszeit für Cholesterol bei 20 min, für Campesterol bei 22,5 min und für Sitosterol bei 25 min. Deuteriertes Campesterol und Sitosterol eluierten ca. 15 Sekunden früher als die unmarkierten Verbindungen. Zur exakten Festlegung der Schnittzeiten für die Phytosterolfraktion wurde zusätzlich ein Aliquot des Studienkontrollserums (Kapitel 3.5) aufgearbeitet und in das HPLC-System injiziert. Das Kontrollserum wurde verwendet, da in diesem, im Gegensatz zu den Standardlösungen, die realen zu erwartenden Sterolkonzentrationsverhältnisse vorlagen. Das Eluat des Sterolextraktes aus dem Kontrollserum wurde von der 19. bis zur 29. Minute nach Injektion in

0,5-Minuten-Fractionen aufgefangen. Das Laufmittel der 0,5-Minuten-Fractionen wurde abgedampft und nach einer Derivatisierung wurden die Sterole in den Fractionen mittels GC/MS analysiert (wie unter Kapitel 4.1.3.4 beschrieben). Die Fractionen 19-20 (Eluat von der 19. bis 20,5. Minute) wurden aufgrund des hohen zu erwartenden Cholesterolgehaltes von der GC/MS-Analyse ausgeschlossen. Über die im SCAN-Modus des MS gewonnenen Massenspektren wurden die Sterole in den Fractionen identifiziert. Es folgte eine weitere GC/MS-Analyse im SIM-Modus und eine halbquantitative Auswertung (ohne internen Standard) über die Peakfläche.

Als erstes wurde D₆-Campesterol in Fraction 21,5 (Eluat von 21,5. bis 22. Minute) detektiert. Als letztes war unmarkiertes Sitosterol in Fraction 26 (Eluat von der 26. bis 26,5. Minute) nachweisbar. In Fraction 26,5 waren keine deuterierten und natürlichen Phytosterole mehr zu finden (**Abbildung 4.2**). Unter Einbezug eines „Sicherheitspuffers“ wurde daher festgelegt, das Eluat von der 21. bis zur 27. Minute nach Probeninjektion aufzufangen, um auf diese Weise deuteriertes und natürliches Campesterol und Sitosterol vom Cholesterol abzutrennen. Bei einem Fluss von 3 ml/min und einer Sammelzeit von 6 min hatte die Fraction mit den Phytosterolen damit ein Volumen von 18 ml.

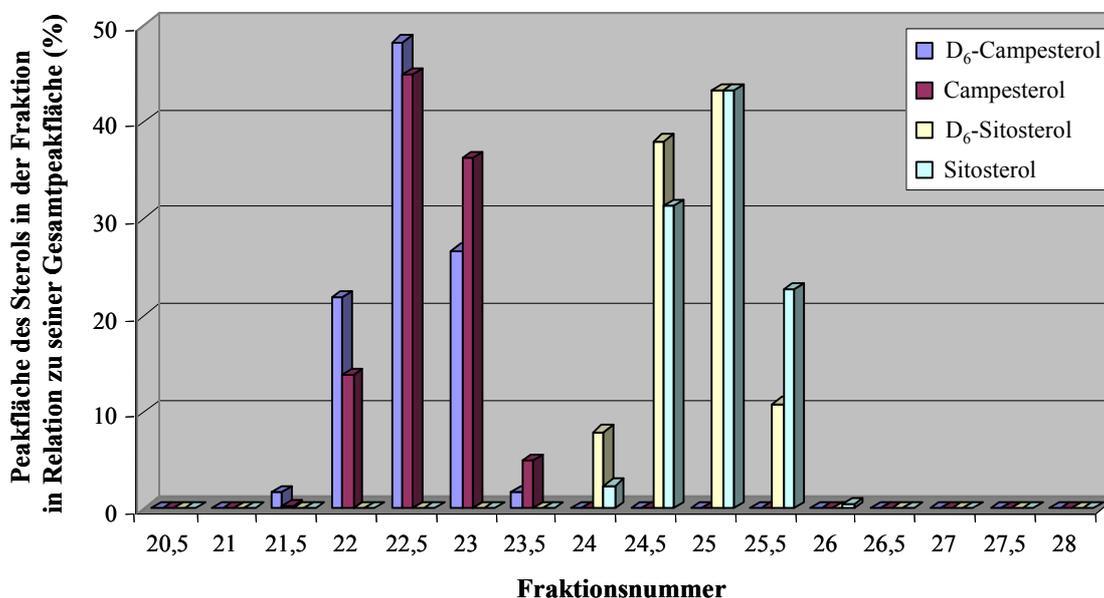


Abbildung 4.2 Deuteriertes und natürliches Campesterol und Sitosterol in 0,5-Minuten-Fractionen des HPLC-Eluats eines Kontrollserums. Die Phytosterole wurden mittels GC/MS-SIM bestimmt (Kapitel 4.1.3). Für jede Fraction ist die Peakfläche des entsprechenden Sterols als prozentualer Anteil an der Gesamtpeakfläche angegeben. Die Gesamtpeakfläche entspricht den aufaddierten Peakflächen aus allen Fractionen, in denen das entsprechende Sterol gefunden wurde. Die Fraktionsnummer weist auf den Beginn der Sammelzeit hin, d.h. für z.B. Fraction 22 wurde das Eluat ab der 22. Minute nach der Probeninjektion für 30 Sekunden aufgefangen.

Durchführung der Fraktionierung

Die Abtrennung der Phytosterole vom Cholesterol mittels präparativer HPLC umfasste damit folgende Schritte:

- Die im HPLC-Vial gelösten Sterole (600 μ l) wurden durch den automatischen Proben- aufgeber auf die HPLC-Säule aufgegeben. Der nach der Injektion im HPLC-Vial ver- bliebene Rückstand wurde quantitativ mit $2 \times 600 \mu$ l Isopropanol in das nach der Ex- traktion aufbewahrte Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden überführt (Kapitel 4.1.3.1, Schritt 5) und darin unter einem Stickstoffstrom bei 65°C zur Trockene eingedampft.
- Das Eluat mit den Phytosterolen wurde von der 21. bis 27. Minute nach Injektion (**Abbildung 4.3**) mittels Fraktionssammler in einem Zentrifugenröhrchen (16×160 mm) gesammelt, in das zuvor 1 μ g Epicoprostanol (10 μ l Epicoprostanol in Cyclohe- xan; 100 μ g/ml) als interner Standard pipettiert worden war.

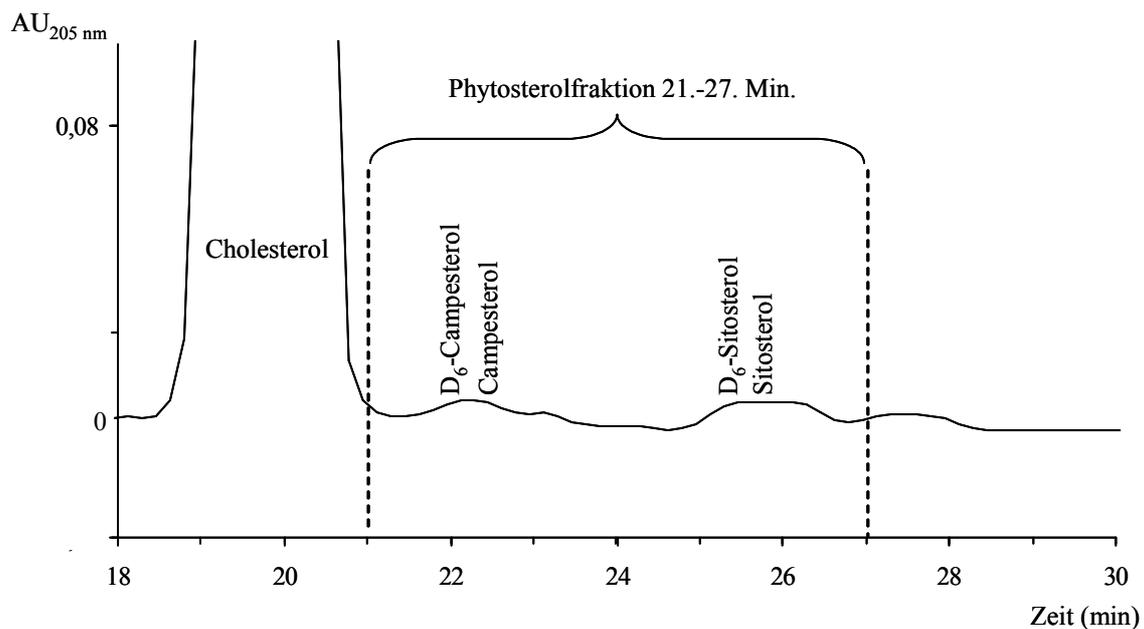


Abbildung 4.3 HPLC-Chromatogramm eines Sterolextrakts aus 750 μ l Kontrollserum. Die Trennung wurde wie beschrieben (Kapitel 4.1.3.2) unter isokratischen Bedingungen mittels HPLC auf einer halbpräparativen C_{18} -Säule ($25 \text{ cm} \times 10 \text{ mm i.D.}$, 5 μm Korngröße) und MeOH/ACN (80:20, v/v) als mobiler Phase mit einer Analysendauer von 50 min durchgeführt. Die Aufzeichnung erfolgte mit Hilfe des PDA-Detektors und Extraktion der Wellenlänge 205 nm. Zur Abtrennung der Phytosterole vom Cholesterol wurde das Eluat von der 21. bis 27. Minute nach Injektion mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen. Aufgrund der bei der präparativen HPLC üblichen Säulenüberladung sind alle Peaks verbreitert.

Anmerkungen: Um die Stabilität der Retentionszeiten zu überprüfen wurde vor jeder HPLC-Sequenz eine Standardlösung mit Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol injiziert. Bei veränderten Retentionszeiten wurde die Sammelzeit im Fraktionssammler entsprechend angepasst. Die Totzeit von Detektor bis Fraktionssammler (20 Sekunden) musste bei der Programmierung des Fraktionssammlers berücksichtigt werden.

- Die abgetrennte Phytosterol-Fraktion (insgesamt 18 ml) wurde unter einem Stickstoffstrom in einem Heizblock bei 80°C auf rund 5 ml eingengt.
- Die eingengte Phytosterolfraktion wurde wieder in das Zentrifugenröhrchen mit Spitzboden (siehe Schritt 1) überführt, so dass die Sterolreste, die nicht auf die HPLC-Säule gelangt waren, auch der weiteren Aufarbeitung zugeführt werden konnten.
- Das übrige Laufmittel wurde bei 65°C unter Stickstoff abgedampft und der Sterolrückstand in 80 µl n-Dekan gelöst. Die Probe wurde in ein GC-Vial mit Mikroinsert überführt und die Sterole darin derivatisiert.

4.1.3.3 Derivatisierung

Für die Derivatisierung der Sterole zu Trimethylsilyl (TMS)-Sterolethern (**Abbildung 4.4** und **Abbildung 4.5**) wurden der Probe im GC-Vial 20 µl TMS-Reagenz zugesetzt und das GC-Vial mit einer Bördekkappe verschlossen. Nach einstündiger Inkubation auf einer Heizplatte bei 80°C wurde die Probe gaschromatographisch/massenspektrometrisch analysiert.

4.1.3.4 GC/MS-Analyse

Im Gegensatz zur Ausgangsmethode (144) wurde ein Probenvolumen von 2 µl anstatt 3 µl in den Gaschromatographen injiziert. Eine Erhöhung des Injektionsvolumens von 2 auf 3 µl hatte keine entscheidenden Vorteile gezeigt, vielmehr war die Injektion von 2 µl mit einem geringeren Rauschen und schmalere Peaks im Chromatogramm verbunden. Die weiteren Analysebedingungen waren wie folgt:

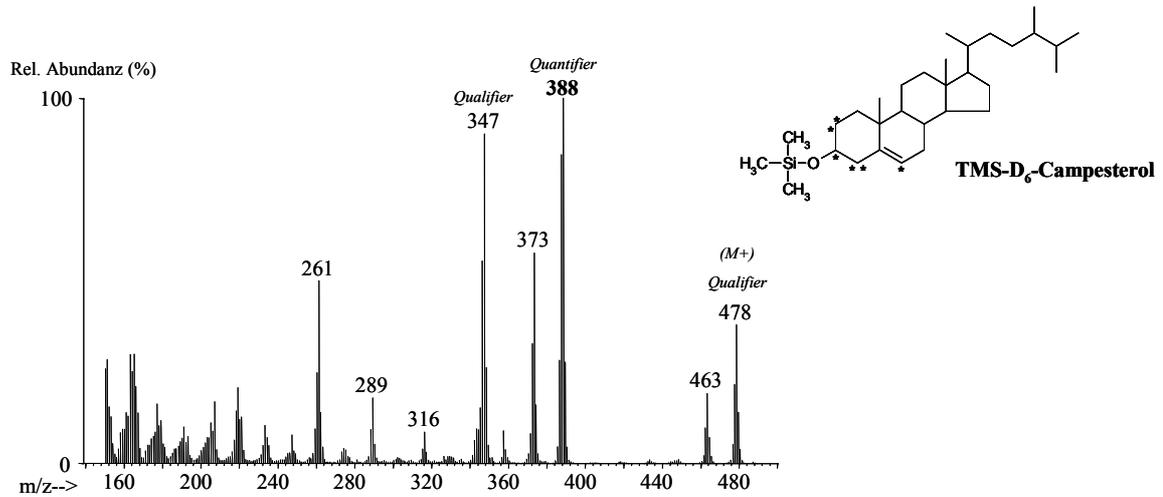
Analysebedingungen

GC:	GC/MS-System 1 (Kapitel 3.3.2)
Injektor:	Injektionsvolumen: 2 μ l Injektionsmodus: splittlos Injektortemperatur: 280 °C
Säule:	DB-XLB Fused-Silica-Kapillarsäule (J&W, Folsom, USA) Länge: 30 m Innerer Durchmesser: 250 μ m Filmdicke: 0,25 μ m
Mobile Phase:	Helium Fluss: 1,1 ml/min Flussgeschwindigkeit: 40 cm/s
Ofen:	Temperaturprogramm: 1. Temperaturstufe: 150 °C, 3 min 2. Temperaturstufe: 290 °C, 12 min 3. Temperaturstufe: 325 °C, 6 min Heizrate: 30 °C/min
Transferline:	Temperatur: 280 °C
MSD:	Einschaltzeitpunkt: 13 min nach Injektion (n.I.) Ionisierung: Elektronenstoß (engl. <i>electron impact</i> , EI) Ionisierungsenergie: 70 eV Multiplierspannung: 2600-3000 V SCAN-Modus: m/z 150-500; SIM-Modus: Für jeden Analyt diente die Masse eines Ions der Quantifizierung (<i>Quantifier</i> -Ion), die Massen von zwei weiteren Ionen zur qualitativen Absicherung (<i>Qualifier</i> -Ionen).

Auswahl der Quantifier- und Qualifier-Ionen für die GC/MS-SIM-Analyse

Die Ionen für die SIM-Messung wurden anhand von Massenspektren der TMS-Sterolether, die im SCAN-Modus gewonnen worden waren, ausgewählt (**Abbildung 4.4**). Um eine möglichst niedrige Nachweisgrenze zu erreichen, wurde für die Quantifizierung von derivatisiertem D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol im SIM-Modus jeweils das Fragmentation mit der höchsten Intensität (Basispeak) ausgewählt. Dies war in beiden Fällen das Ion, das durch die Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe $[M-(TMSi-OH)]^+$ entsteht (m/z 388 für D₆-Campesterol und m/z 402 für D₆-Sitosterol). Als Qualifier-Ionen wurden für beide derivatisierten deuterierten Sterole charakteristische Fragmente mit hohen Massen und möglichst hohen Intensitäten gewählt. Dies waren zum einen die jeweiligen Molekülionen $[M]^+$ mit m/z 478 bzw. m/z 492, zum anderen die Fragmentationen mit m/z 347 bzw. m/z 361, die durch einen Ring A-Bruch $[M-(TMSi-O-CH-CH=CH_2)]^+$ entstehen. Mit dem Ringbruchstück werden bei den deuterierten Phytosterolen zwei der am A-Ring positionierten Deuterien mit abgespalten.

A



B

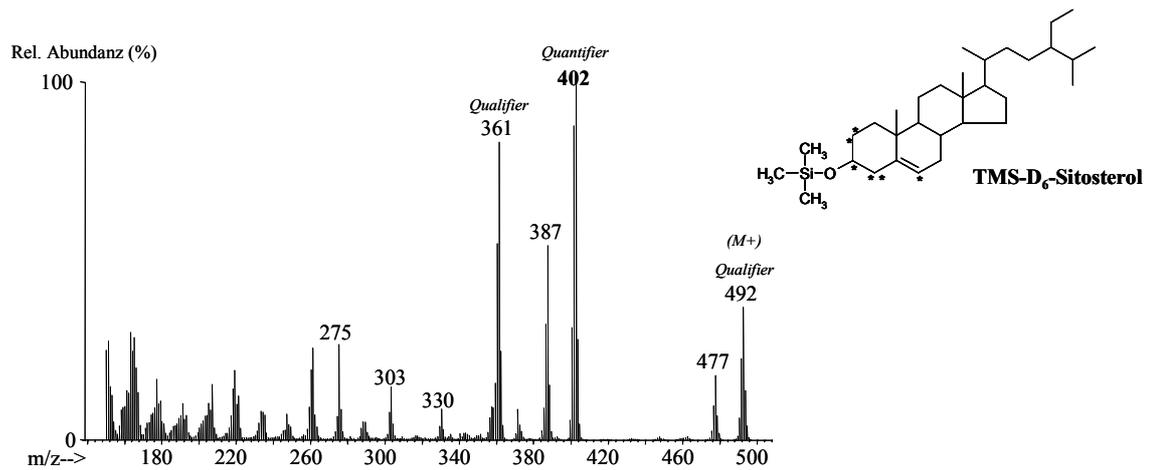


Abbildung 4.4 Massenspektrum und Strukturformel des Trimethylsilyletherderivates von D₆-Campesterol (TMS-D₆-Campesterol; Abb. A) und des Trimethylsilyletherderivates von D₆-Sitosterol (TMS-D₆-Sitosterol; Abb. B). Das nach der Fragmentierung der derivatisierten Moleküle jeweils häufigste und stabilste Fragmentation wurde für die Quantifizierung im SIM-Modus verwendet (Quantifier-Ion). Das Molekülion (M⁺) und ein weiteres Fragmentation hoher Abundanz dienten dazu die Peakidentität im SIM-Modus zu bestätigen (Qualifier-Ionen).

Für die Quantifizierung der derivatisierten natürlichen Phytosterole wurde jeweils das Molekülion (m/z 472 für Campesterol und m/z 486 für Sitosterol) gewählt, da aufgrund ihrer höheren Serumkonzentrationen eine Steigerung der Empfindlichkeit der Analyse nicht notwendig war. Als Qualifier-Ionen dienten jeweils die Fragmentationen, die durch die Abtrennung der Trimethylsilanolgruppe (m/z 382 bzw. 396) und durch den Bruch im A-Ring des Sterangerüsts (m/z 343 bzw. 357) entstehen (**Abbildung 4.5**).

Der interne Standard Epicoprostanol wurde auf dem Fragmention mit m/z 370, das durch Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe entsteht, quantifiziert.

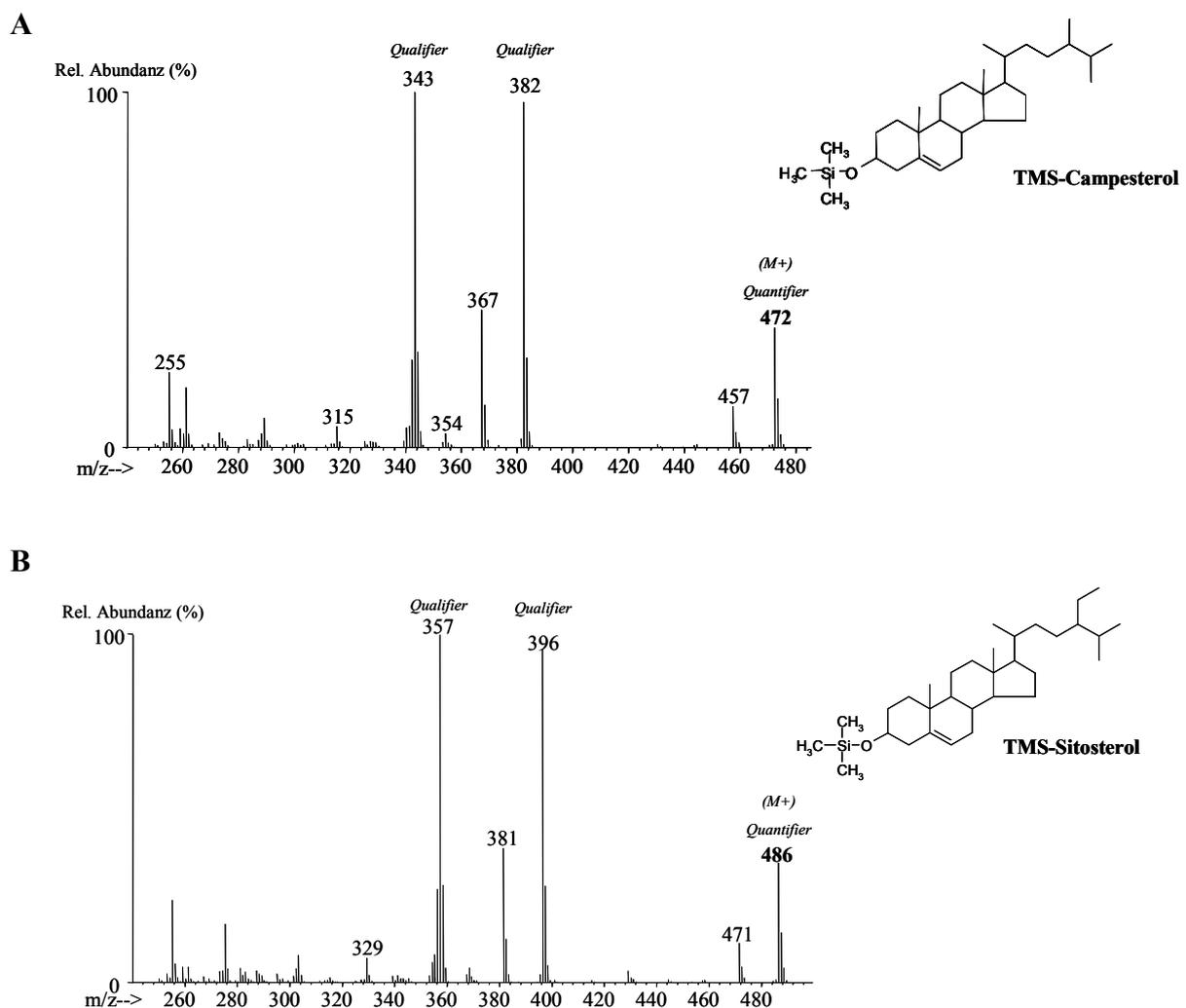


Abbildung 4.5 Massenspektrum und Strukturformel des Trimethylsilyletherderivates von Campesterol (TMS-Campesterol; Abb. A) und des Trimethylsilyletherderivates von Sitosterol (TMS-Sitosterol; Abb. B). Das jeweilige Molekülion (M^+) wurde für die Quantifizierung im SIM-Modus verwendet (Quantifier-Ion). Zwei weitere charakteristische Fragmentationen mit hoher Abundanz dienen dazu die Peakidentität im SIM-Modus zu bestätigen (Qualifier-Ionen).

Die Aufzeichnung der ausgewählten Ionenmassen (Selective Ion Monitoring, SIM) mittel MS erfolgte in festgelegten Zeitfenstern, die sich nach der Retentionszeit des jeweiligen Sterolderivates richteten. Dabei wurde die Dwell-Time, das heißt die Messzeit pro Masse, so eingestellt, dass die Scan-Rate zwischen 2-3 Zyklen pro Sekunde lag (**Tabelle 4.2**).

Tabelle 4.2 SIM-Einstellungen (Massen/Ladungsverhältnisse (m/z) der Fragmentionen, Zeitfenster, Dwell-Time) für die massenspektrometrische Detektion der Trimethylsilyl-Sterolderivate

TMS-Derivat von	Zeitfenster	Dwell-Time	Quantifier-Ion	Qualifier-Ion 1	Qualifier-Ion 2
			m/z		
Epicoprostanol	13,0-14,8 min	100 ms	370		
D ₆ -Campesterol	17,0-18,6 min	50 ms	388	478 (M ⁺)	347
Campesterol	17,0-18,6 min	50 ms	472 (M ⁺)	382	343
D ₆ -Sitosterol	18,6-20,0 min	50 ms	402	492 (M ⁺)	361
Sitosterol	18,6-20,0 min	50 ms	486 (M ⁺)	396	357

M⁺ = Molekülion

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der TMS-Sterolether erfolgte über die Retentionszeit und das Responseverhältnis von Quantifier- und Qualifier-Ionen. Für die Quantifizierung wurden die Ionenspurten der jeweiligen Quantifier-Ionen der derivatisierten Sterole herangezogen. Die Auswertung der Chromatogramme (Bestimmung der Peakflächen) erfolgte mittels der ChemStation-Software. Die Integrationsparameter waren zuvor für jeden Peak einzeln bestimmt worden, so dass die Basislinien der Peaks automatisch mittels der Software erstellt werden konnten. Die automatische Integration wurde bei jedem Peak überprüft. Bei offensichtlichen Fehlintegrationen wurden die betroffenen Peaks erneut über die manuelle Funktion der Software integriert. Die Peakflächen wurden automatisch in ein Microsoft Excel-Tabellenblatt übertragen. Die mittels linearer Regressionsanalyse ermittelten Gleichungen der Kalibriergeraden (Kapitel 4.1.6.3) wurden verwendet, um aus den Peakflächenverhältnissen von Analyt zu internem Standard die entsprechenden Sterolkonzentrationen in den Studienseren zu bestimmen.

4.1.4 Bestimmung von deuteriertem und natürlichem Cholesterol im Serum

Für die simultane Bestimmung von D₆- und D₀-Cholesterol mussten die Konzentrationen im GC-Vial deutlich verringert werden, um die Kapillarsäule bei einem Injektionsvolumen von 2 µl nicht mit natürlichem Cholesterol zu überladen. Gleichzeitig sollte jedoch dadurch die Konzentration des D₆-Cholesterols nicht unter die Nachweisgrenze fallen. Die Substanzmenge auf der Säule wurde im Vergleich zu der Ausgangsmethode daher um den Faktor 75 vermindert. Dies erfolgte durch eine 10-fache Verminderung des eingesetzten Serumvolumens, durch Aufnahme der extrahierten Sterole in einem 5-fach höheren Lösemittelvolumen sowie durch die 1,5-fache Verminderung des Injektionsvolumens am GC (**Abbildung 4.6**). Damit sollten auch nach Aufarbeitung der Probe mit der niedrigsten erwarteten D₆-Cholesterolkonzentration (ca. 17 µg/dl, Kapitel 4.1.1) noch knapp 10 pg D₆-Cholesterol auf die Säule gelangen. Die Aufarbeitung der Serumproben wird im Folgenden in Kürze beschrieben.

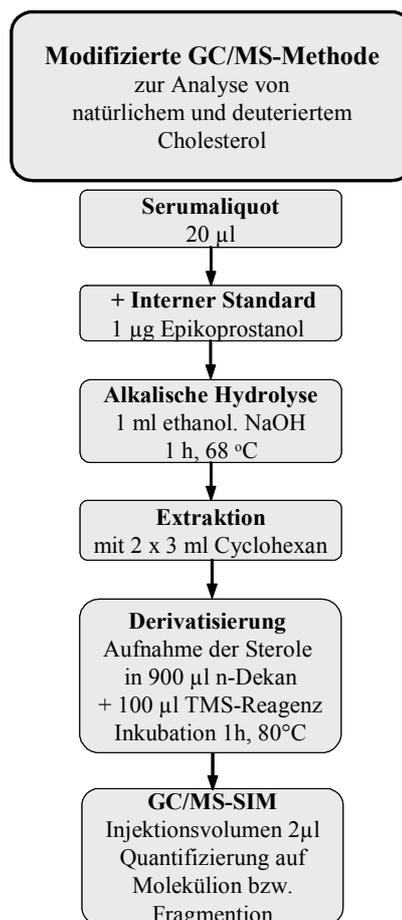


Abbildung 4.6 Schematischer Ablauf der Bestimmung von deuteriertem und natürlichem Cholesterol im Serum.

4.1.4.1 *Serumaufarbeitung*

- 1 µg interner Standard (10 µl Epicoprostanol in Cyclohexan; 100 µg/ml) wurde in ein Zentrifugenröhrchen aus Glas mit Schraubverschluss (16 × 100 mm) pipettiert und das Lösungsmittel unter leichtem Stickstoffstrom bei 65°C abgedampft. Dem Rückstand wurden 20 µl Serum zugesetzt.
- Aufgrund des verringerten Serumvolumens wurde für die alkalische Hydrolyse nur 1 ml anstatt 1,5 ml 1N Natriumhydroxidlösung in 90 % Ethanol verwendet. Das Zentrifugenröhrchen wurde fest verschlossen, kurz geschüttelt und 1 Stunde im Schüttelwasserbad bei 68°C inkubiert.
- Nachdem der Probe 500 µl Aqua bidest. zugegeben worden waren, wurden die neutralen Sterole mit 2 × 3 ml Cyclohexan extrahiert (1 min schütteln und danach 10 min bei 2000 U/min und 18 °C zentrifugieren).
- Die oberen Cyclohexanphasen mit den darin gelösten neutralen Sterolen wurden jeweils abgehoben, in einem separaten Zentrifugenröhrchen vereinigt und unter Stickstoffbegasung in einem Heizblock bei 65°C zur Trockene eingedampft. Die Sterole wurden durch Zugabe von 900 µl n-Dekan gelöst und mit einer Pasteurpipette in ein GC-Vial überführt.
- Die Derivatisierung der Sterole zu TMS-Sterolethern (**Abbildung 4.7**) erfolgte wie bereits beschrieben (Kapitel 4.1.3.3) durch Zusatz von 100 µl TMS-Reagenz.

4.1.4.2 *GC/MS-Analyse*

Analysebedingungen

Instrument und Analysebedingungen für die GC/MS-Bestimmung von natürlichem und deuterierten Cholesterol waren dieselben wie bereits für die Analyse der Phytosterole beschrieben (Kapitel 4.1.4.2). Außer der Auswahl der Ionenmassen und der Einstellung der entsprechenden SIM-Parameter wurden keine Veränderungen vorgenommen (**Tabelle 4.3**).

Tabelle 4.3 SIM-Einstellungen (Massen/Ladungsverhältnisse (m/z) der Fragmentionen, Zeitfenster, Dwell-Time) für die massenspektrometrische Detektion der Trimethylsilyl-Sterolderivate

TMS-Derivat von	Zeitfenster	Dwell-Time	Quantifier-Ion	Qualifier-Ion 1	Qualifier-Ion 2
			m/z		
Epicoprostanol	13,0-14,8 min	100 ms	370		
D ₆ -Cholesterol	14,8-17,0 min	40 ms	335	464 (M ⁺)	374
Cholesterol	14,8-17,0 min	40 ms	458 (M ⁺)	329	368

M⁺ = Molekülion

Auswahl der Quantifier- und Qualifier-Ionen für die GC/MS-SIM-Analyse

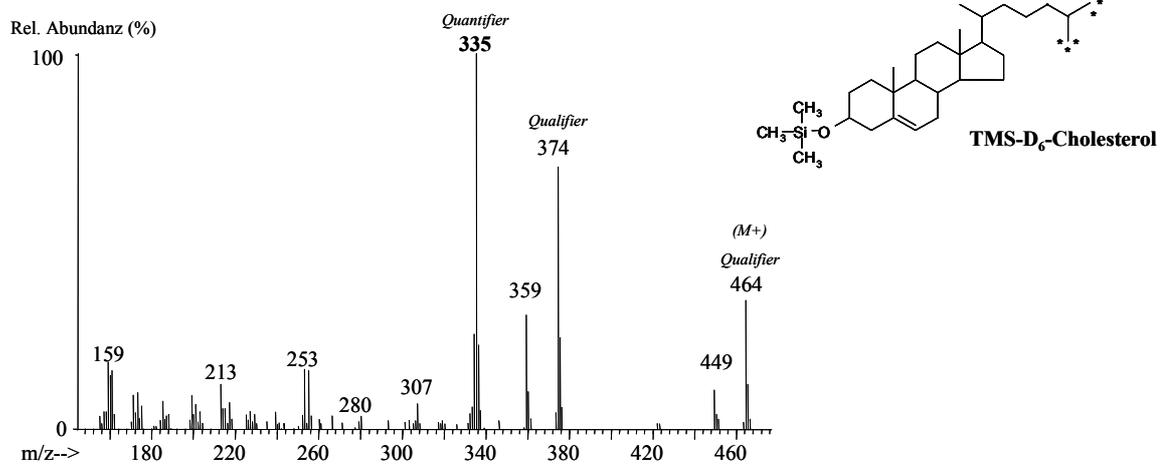
Als Quantifier-Ion für das derivatisierte D₆-Cholesterol wurde das Fragmention mit der höchsten Intensität m/z 335, das durch einen Bruch im Ring A des Molekülions entsteht [M-(TMSi-O-CH-CH=CH₂)]⁺, herangezogen. Dieses Fragment enthielt keine Deuterien, da D₆-Cholesterol nicht im Ring, sondern an den Kohlenstoffatomen der Positionen 26 und 27 in der Seitenkette deuteriert war. Qualifier-Ionen für das derivatisierte D₆-Cholesterol waren das Molekülion [M]⁺ mit m/z 464 und das Fragmention mit m/z 374, das durch die Abspaltung der Trimethylsilyanolgruppe entsteht [M-(TMSi-OH)]⁺ und im Massenspektrum die zweithöchste Intensität aufweist (**Abbildung 4.7 A**).

Für die Quantifizierung des derivatisierten natürlichen Cholesterols wurde das Molekülion mit m/z 458 gewählt (**Abbildung 4.7 B**), da aufgrund der sehr hohen Serumkonzentration eine Steigerung der Empfindlichkeit der Analyse nicht notwendig war. Als Qualifier-Ionen dienten die Fragmentionen mit m/z 368 und m/z 329, die durch die Abtrennung der Trimethylsilyanolgruppe bzw. den Bruch im A-Ring des Sterangerüsts entstehen. Der interne Standard Epicoprostanol wurde wie bei der Analyse der Phytosterole auf m/z 370 quantifiziert.

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung und Quantifizierung von derivatisiertem Cholesterol und D₆-Cholesterol in den Proben erfolgte wie bereits unter Kapitel 4.1.3.4 für die Analyse der Phytosterole beschrieben.

A



B

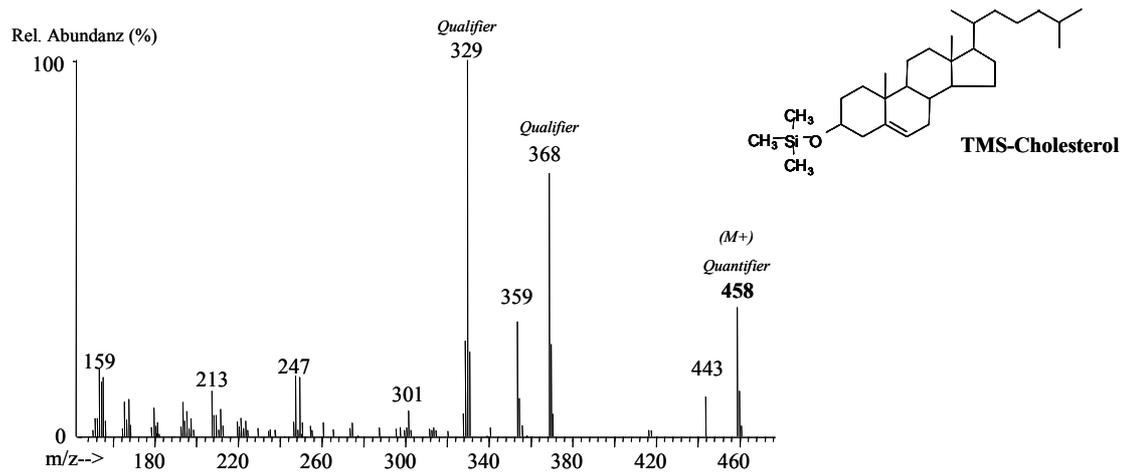


Abbildung 4.7 Massenspektrum und Strukturformel des Trimethylsilyletherderivates von D₆-Cholesterol (TMS-D₆-Cholesterol; Abb. A) und des Trimethylsilyletherderivates von Cholesterol (TMS-Cholesterol; Abb. B). Das nach der Fragmentierung von TMS-D₆-Cholesterol am häufigsten vorkommende und stabilste Fragmentation wurde für die Quantifizierung im SIM-Modus verwendet (Quantifier-Ion). Das Molekülion (M⁺) und ein weiteres Fragmentation hoher Abundanz dienten dazu, die Peakidentität von TMS-D₆-Cholesterol im SIM-Modus zu bestätigen (Qualifier-Ionen). Für die Quantifizierung von TMS-Cholesterol im SIM-Modus wurde das Molekülion als Quantifier-Ion herangezogen und zwei charakteristische Fragmentationen mit hoher Abundanz als Qualifier-Ionen verwendet.

4.1.5 Maßnahmen zur Qualitätssicherung

Pipetten und Waage

Die volumenvariablen Pipetten (Typ Reference 10-100 μl und 100-1000 μl), die für kritische Volumina (z.B. Lösung mit internem Standard, Serumaliquote) verwendet werden sollten, wurden vor ihrem Einsatz mit Aqua bidest. und einer Analysenwaage auf ihre Genauigkeit und Präzision überprüft. Die Analysenwaage war mit zertifizierten Gewichten kalibriert worden. Lösungen und Reagenzien, bei denen die Genauigkeit weniger relevant war, wurden mit einer variablen Multipipette[®] (Typ Plus) und den entsprechenden Pipettenaufsätzen (Combi-Tip[®] 1 ml, 5 ml und 50 ml) pipettiert.

Qualitätskontrolle

Als Qualitätskontrolle diente jeweils ein Aliquot des Kontrollserums (Kapitel 3.5), das mit den Proben nach Analysenvorschrift aufgearbeitet und analysiert wurde. Bei einer typischen Probensequenz am GC/MS wurde von den Proben mit unbekannter Konzentration eine Einfachbestimmung und von den Kalibrierproben eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierproben wurden dazu in der Reihenfolge aufsteigender Konzentrationen jeweils zu Beginn und am Ende der Probensequenz injiziert. Um Verschleppungen von einem Probenlauf in den nächsten (sog. Memory-Effekt) zu vermeiden, wurde nach jeweils rund sechs Injektionen n-Dekan injiziert.

Wartung

Das Septum und das Verdampfrohr (Liner) mit Glaswolle im GC-Injektor wurden nach rund 100-200 Injektionen gewechselt. Zu der allgemeinen Wartung des GC/MS-Systems gehörte außerdem eine regelmäßige Säuberung der Ionenquelle und bei Bedarf eine Erneuerung der Filamente und der Säule. Vor jedem Start einer Probensequenz an den GC/MS-Geräten wurde ein Tuning durchgeführt.

Verhinderung der Kontamination mit Sterolen

Da pflanzliche Sterole in natürlichem Kautschuk enthalten sind (148), stellen Labormaterialien aus Gummi mögliche Kontaminationsquellen für pflanzliche Sterole dar. Es wurden daher gummihaltige Materialien, die für die Aufarbeitung der Serumproben zunächst verwendet werden sollten, qualitativ auf Sitosterol untersucht. Zu den untersuchten Materialien gehörten:

- Dichtung der Schraubdeckel für Zentrifugenröhrchen (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, Deutschland)
- Septum der Aluminiumkappe für GC-Vial (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, Deutschland)
- Latexhandschuhe (Typ SafeSkin SatinPlus™, Kimberly-Clark, Rosswell, GA, USA).

Es wurde jeweils ein Stück des Materials in ein Reagenzglas gegeben, rund 3 ml Cyclohexan zugesetzt und 1 min geschüttelt. Daraufhin wurden 900 µl der Probe in ein GC-Vial überführt und 100 µl TMS-Reagenz zugesetzt. Die Probe wurde im verschlossenen GC-Vial bei 85 °C inkubiert und nach 1 Stunde mittels GC/MS (Kapitel 4.1.4.2) analysiert. Eine Cyclohexan-Blindprobe diente als Kontrolle. Die Auswertung der Messung ergab, dass in allen Proben außer in der Kontrolle Sitosterol (gemessen auf m/z 486) enthalten war. Es wurden daher folgende Maßnahmen ergriffen, um Sterolkontamination zu vermeiden:

In alle Schraubdeckel, die eine Gummidichtung enthielten, wurde mit einer Pinzette eine Dichtscheibe aus Teflon (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, Deutschland) gelegt, die nachweislich kein Sitosterol enthielt. Zum Verschließen der GC-Vials wurden Bördelkappen aus Aluminium mit einem Teflon-beschichteten Septum (VWR International, Leuven, Belgien), in dem kein Sitosterol nachgewiesen wurde, verwendet. Während der Aufarbeitung der Serumproben wurde außerdem darauf geachtet, dass Flächen, die in Verbindung mit der Probe kommen (z.B. Pipettenspitzen, Innenwände von Glasröhrchen), nicht mit Latexhandschuhen angefasst wurden. Benötigte Glasgefäße, Kolben und Stopfen wurden generell vor der Verwendung mit Methanol/Aceton oder Cyclohexan ausgespült und getrocknet.

4.1.6 Methodvalidierung

Die beiden beschriebenen Messmethoden zur Bestimmung der deuterierten und natürlichen Phytosterole bzw. deuteriertem und natürlichem Cholesterol wurden einer Validierung unterzogen, um die Methoden zu charakterisieren und sicherzustellen, dass sie verlässliche und reproduzierbare Messwerte liefern. In Anlehnung an die Leitlinien der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) wurden dazu die Validierungsparameter Selektivität, Kalibrierung (Linearität), Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Richtigkeit und Präzision überprüft (149).

4.1.6.1 Selektivität

Für jede Substanz wurden anhand der Massenspektren neben dem Molekülion zwei weitere charakteristische Fragmentationen mit möglichst hoher Intensität für die SIM-Analyse ausgewählt, um die Identität des Sterolpeaks abzusichern. Eine ausreichende Selektivität war gegeben, wenn die Peakflächenverhältnisse der drei Ionen in den Proben konstant waren und mit den Peakflächenverhältnissen in der Reinsubstanz übereinstimmten (tolerierte Abweichungen $\pm 20\%$).

4.1.6.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden durch die Analyse von Serumproben mit bekannter niedriger Konzentration auf Basis des Verhältnisses von Peakhöhe zur Rauschbreite (*signal to noise*, S/N) ermittelt. Als Nachweisgrenze galt die Konzentration bzw. Menge des Analyts auf der Säule, die einen Peak liefert, dessen Peakhöhe (=Signal) dreimal über der Rauschbreite liegt (S/N = 3:1). Für die Bestimmungsgrenze galt ein S/N-Verhältnis von 9:1. Das S/N-Verhältnis für einen Peak wurde automatisch mittels der Chromatographie-Software generiert. Zur Ermittlung des mittleren Rauschens der Basislinie wurde ein Bereich direkt neben dem Analytpeak angegeben, der ca. der fünffachen Breite des Peaks entsprach.

4.1.6.3 Kalibrierung

Herstellung der Kalibrierproben

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen mit aufsteigender D₆-Cholesterolkonzentration wurden aufsteigende Aliquote einer D₆-Cholesterol-Stammlösung (22 µg/ml in Cyclohexan) jeweils auf 4 ml mit Cyclohexan in einem Glasvial verdünnt. Die Kalibrierlösungen für nicht-markiertes Cholesterol wurden auf dieselbe Weise hergestellt und einzeln mittels GC/FID quantifiziert (Kapitel 4.2). Für die Aufarbeitung der Kalibrierproben wurden jeweils 20 µl der Cholesterol- und D₆-Cholesterol-Kalibrierlösung (**Tabelle 4.4**) zusammen in ein Zentrifugenröhrchen aus Glas mit 1 µg internem Standard (10 µl Epicoprostanol in Cyclohexan; 100 µg/ml) pipettiert. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff bei 65°C abgedampft und die direkt anschließende Derivatisierung der Sterole erfolgte wie für die Serumproben beschrieben (Kapitel 4.1.3.3).

Tabelle 4.4 Konzentration von D₆-Cholesterol und Cholesterol in den Kalibrierlösungen

Sterol	Kalibrierlösungen									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D ₆ -Cholesterol (mg/dl)	0	0,02	0,06	0,12	0,18	0,24	0,30	0,45	-	-
Cholesterol (mg/dl)	-	84	123	159	198	220	261	300	327	363

Zur Herstellung der Kalibrierproben mit definierten Phytosterolkonzentrationen (**Tabelle 4.5**) wurden von einer D₆-Campesterol/D₆-Sitosterol-Stammlösung (D₆-Campesterol: 0,695 µg/ml; D₆-Sitosterol: 0,838 µg/ml) aufsteigende Volumina (0 und 10 µl einer 1:10 Verdünnung und 10, 45, 80, 115, 150 und 300 µl der unverdünnten Lösung) in Zentrifugenröhrchen aus Glas pipettiert. Nach Abdampfen des Cyclohexans unter Stickstoff wurden die Sterolrückstände mit aufsteigenden Volumina (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µl) des Poolserums 1 (Kapitel 3.5), dessen Campesterol- und Sitosterolkonzentration bekannt war, versetzt. Um in der achten Kalibrierprobe eine vergleichbare Matrix zu schaffen, wurden auch diesem Zentrifugenröhrchen 400 µl Serum zugesetzt. Die acht Kalibrierproben durchliefen gemeinsam mit den Studienserum alle Schritte der Probenaufbereitung (alkalische Hydrolyse, Extraktion, HPLC-Fraktionierung, Derivatisierung; Kapitel 4.1.3)

Tabelle 4.5 Konzentration der deuterierten und natürlichen Phytosterole in den Kalibrierproben

Sterol	Kalibrierprobe							
	1	2	3	4	5	6	7	8
D ₆ -Campesterol (µg/dl)	0	0,09	0,93	4,17	7,41	10,66	13,90	27,80
D ₆ -Sitosterol (µg/dl)	0	0,11	1,12	5,03	8,94	12,85	16,76	33,52
Campesterol (µg/dl)	0	62	123	246	369	493	616	
Sitosterol (µg/dl)	0	43	87	174	261	347	434	

Kalibrierung

Die Kalibrierkurve beschreibt die mathematische Beziehung zwischen dem gemessenen Signal und den bekannten Konzentrationen in den gemessenen Kalibrierproben. Für jeden Analyt (D₆-Cholesterol, D₀-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₀-Campesterol, D₆-Sitosterol und D₀-Sitosterol) wurde der erwartete Konzentrationsbereich auf Linearität überprüft. Dazu wurden die Kalibrierproben in Doppelbestimmung am GC/MS unter denselben Analysebedingungen

wie für die Serumproben beschrieben analysiert (Kapitel 4.1.4.2 und 4.1.3.4). Die Peakflächenverhältnisse von Analyt zu internem Standard aus den Doppelbestimmungen der einzelnen Kalibrierproben wurden gemittelt und als y -Werte gegen die Analytkonzentration in den Kalibrierproben auf der x -Achse aufgetragen. Zunächst wurde nach optischen Kriterien beurteilt, ob ein linearer Zusammenhang gegeben war. Die Daten wurden danach einer linearen Regressionsanalyse (SPSS, Version 12.0) unterzogen, in der die Parameter a und b der folgenden linearen Gleichung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt wurden:

$$y = ax + b$$

mit: x Konzentration des Analyts
 y Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard
 a Steigung
 b y -Achsenabschnitt

Ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen wurde statistisch dadurch bestätigt, dass sich die Steigung a der Kalibriergeraden statistisch signifikant und der y -Achsenabschnitt b statistisch nicht signifikant von Null unterscheiden (150). Ein Maß für den Grad der Anpassung des linearen Modells an die experimentell ermittelten Werte liefert das Bestimmtheitsmaß B , das dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten r entspricht. B nimmt Werte aus dem Intervall $[0, 1]$ an. Betragsmäßig hohe B -Werte ergeben sich bei einer guten Anpassung der Punkteschar an die Gerade (B nahe +1). Eine schlechte Übereinstimmung führt zu betragsmäßig kleinen B -Werten (151). Als Richtgröße für die Kalibrationsgerade wurde in der vorliegenden Arbeit ein Mindestwert von $B > 0,995$ festgelegt.

4.1.6.4 Richtigkeit

Die Prüfung der Richtigkeit erfolgte durch die Analyse von Proben mit bekannten Sterolkonzentrationen (Validierungsproben) und dem Vergleich des Messergebnisses mit dem zu erwartenden Ergebnis. Da für die Sterole keine zertifizierten Referenzmaterialien zur Verfügung standen, wurden für die beiden Messmethoden Validierungsproben hergestellt. Dazu wurden Aliquoten des zuvor 1:10 mit Kochsalzlösung verdünnten Poolserums 2 bekannte Mengen der Analyten zugesetzt. Im Einzelnen wurden für die Cholesterolmethode analog zur Methodenvorschrift 20 μ l- und für die Phytosterolmethode 750 μ l-Poolserum-Aliquote verwendet. Die Sterole wurden in drei bis vier Konzentrationsniveaus jeweils sechs Aliquoten zugesetzt, so dass der untere, mittlere und obere zu erwartende Konzentrationsbereich abge-

deckt war. Die Proben wurden wie beschrieben aufgearbeitet und am GC/MS quantifiziert (Kapitel 4.1.3 und 4.1.4). Das Poolserum 2 wurde unverdünnt mitanalysiert und die Ergebnisse durch 10 geteilt, um die Verdünnung zu berücksichtigen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Kromidas (152) unter Anwendung statistischer Tests und Vergleich der Testwerte mit Tabellenwerten: Die Normalverteilung der sechs Messwerte jeder Konzentrationsstufe wurde mit dem *R/s*-Test nach David auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von 99 % nachgewiesen. Ob es sich bei einem abweichenden Wert um einen Ausreißer oder um eine zufällige Abweichung handelt, wurde mit dem Dixon-Test auf dem 99 %-Wahrscheinlichkeitsniveau überprüft. Ermittelte Ausreißer wurden von der weiteren Datenauswertung ausgeschlossen. Als Maß für die Richtigkeit wurde das relative Verhältnis des mittleren Messwertes zum Sollwert berechnet:

$$\text{Richtigkeit} = \frac{c_{\text{gemessen}}}{c_{\text{soll}}} \times 100\%$$

mit: c_{gemessen} mittlere gemessene Konzentration
 c_{soll} Sollkonzentration

Für die deuterierten Sterole entsprachen die Sollkonzentrationen in den Proben den zugesetzten Konzentrationen. Für die natürlichen Sterole ergaben sich die Sollkonzentrationen jeweils aus der zugesetzten Sterolkonzentration zuzüglich der bereits vorhandenen Konzentration des entsprechenden Sterols in der Serummatrix. Im Idealfall entspricht die mittlere gemessene Konzentration der Sollkonzentration (100 % Richtigkeit). Nach den Leitlinien der FDA (149) galten als Akzeptanzkriterium für die Richtigkeit Werte von 85 bis 115 %.

4.1.6.5 Präzision

Es wurde zwischen zwei Präzisionsarten unterschieden: Zum einen die Streuung der Messwerte, die auftritt, wenn ein Serum von einer Person innerhalb eines Tages mehrfach aufgearbeitet und alle Proben in einer Serie am GC/MS analysiert werden (Intra-Assay-Präzision). Zum anderen die Streuung der Messwerte, die entsteht, wenn ein Serum von einer Person an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und in verschiedenen Serien am GC/MS analysiert wird (Inter-Assay-Präzision). Die Intra-Assay-Präzision wurde im Rahmen des Versuchs zur Methodenrichtigkeit aus den Sechsfachbestimmungen der Validierungsproben ermittelt. Zur Be-

stimmung der Inter-Assay-Präzision wurden die Ergebnisse der Qualitätskontrollen herangezogen. Als Qualitätskontrolle wurde mit jeder Probenserie ein Aliquot des Kontrollserums (siehe Kapitel 3.5) mitanalysiert. Als Maß für die Präzision wurde die relative Standardabweichung, die identisch ist mit dem Variationskoeffizienten, nach folgender Gleichung berechnet:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

mit: Variationskoeffizient in %
 s Standardabweichung
 \bar{x} Mittelwert aus den Messwerten

Nach den Leitlinien der amerikanischen FDA galt als Akzeptanzkriterium für die Präzision ein $\leq 15\%$ und für Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze $\leq 20\%$ (149).

4.2 Bestimmung von neutralen Sterolen mittels GC/FID

Die Methode von Czubyko *et al.* (153) ist eine vereinfachte Methode zur Quantifizierung fäkaler neutraler und saurer Sterole mittels Gaschromatographie/Flammenionisationsdetektion (GC/FID) basierend auf einer Methode von Miettinen *et al.* (104). Sie wurde mit geringen Modifikationen in dieser Arbeit zur Analyse der natürlichen Sterole in den Poolseren und zur Überprüfung des Sterolgehalts in den Standardlösungen eingesetzt.

4.2.1 Probenaufbereitung

50 μg interner Standard (50 μl 5 α -Cholestan in Cyclohexan; 1 mg/ml) und 1 μg externer Standard (10 μl Epicoprostanol in Cyclohexan; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden mit einem 100 μl -Serumaliquot versetzt. Nach alkalischer Hydrolyse mit 1N ethanolischer (90 %) Natriumhydroxidlösung und Extraktion der Sterole mit Cyclohexan wurden diese zu TMS-ether-Sterolen derivatisiert. Für die Analysen der Sterole in den Standardlösungen wurden je nach erwarteter Konzentration Aliquote der Standardlösungen (20-150 μl) zugesetzt, das Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung bei 65°C abgedampft und die Sterole direkt derivatisiert. Von allen Proben wurden mindestens drei Aliquote aufgearbeitet und analysiert.

4.2.2 GC/FID

Analysebedingungen

GC:	GC/FID-System (Kapitel 3.3.1)
Injektor:	Injektionsvolumen: 2 μ l Injektionsmodus: splittlos Injektortemperatur: 280 °C
Säule:	DB-XLB Fused-Silica-Kapillarsäule (J&W, Folsom, CA, USA) Länge: 30 m Innerer Durchmesser: 250 μ m Filmdicke: 0,25 μ m
Mobile Phase:	Wasserstoff Fluss: 1,1 ml/min
Ofen:	Anfangstemperatur 150°C für 3 min Endtemperatur 290°C für 22 min Heizrate 30 °C/min
FID:	Wasserstofffluss: 30 ml/min Luftfluss: 400 ml/min

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der Sterole in der Probe erfolgte über die Retentionszeit. Die Auswertung der Chromatogramme (Bestimmung der Peakflächen) wurde mittels der ChemStation Software durchgeführt. Aus dem Verhältnis von Peakfläche des zu bestimmenden Sterols zur Peakfläche des internen Standards wurde durch Multiplikation mit der zugegebenen Menge an internem Standard die Menge der entsprechenden Sterole in dem eingesetzten Probenali-quot bestimmt (1-Punktkalibrierung).

4.3 Bestimmung der Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese

Die Cholesterolresorptions- und Cholesterolsynthesedaten aus der klinischen Studie wurden im analytischen Labor der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn ermittelt und in die vorliegende Arbeit mit einbezogen.

Die Bestimmung der Cholesterolresorption erfolgte nach der *continuous feeding dual stable isotope method* von Lütjohann *et al.* (39) über die Analyse von oral verabreichtem D₆-Cholesterol, seinen Metabolisierungsprodukten D₆-Coprostanol, D₆-Coprostanon und dem nicht-resorbierbaren, oral verabreichten *fecal flow marker* D₄-Sitostanol in den Stuhlproben der Studienteilnehmer. Die Aufarbeitung der Stuhlproben umfasste eine alkalische Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung der Sterol zu TMS-Derivaten. Die GC/MS-SIM-Analyse der derivatisierten Sterole wurde mit dem GC/MS-System 2 (Kapitel 3.3.2) und einer DB-XLB Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm i.D. × 0,25 µm Filmdicke; J&W, Folsom, USA) mit Helium als Trägergas durchgeführt (39). Die Cholesterolresorption wurde danach nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Cholesterol-Resorption (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\frac{A_{D6-Ch} + A_{D6-Coprol} (FAECES)}{A_{D4-Sitol}}}{\frac{A_{D6-Ch} (KAPSEL)}{A_{D4-Sitol}}} \right)$$

mit: A_{D6-Ch} = Peakfläche für D₆-Cholesterol

$A_{D6-Coprol}$ = Peakfläche für D₆-Coprostanol

$A_{D4-Sitol}$ = Peakfläche für D₄-Sitostanol

D₆-Coprostanon war in den Stuhlproben nicht nachweisbar und wurde daher nicht in die Berechnung miteinbezogen. Um die Flächen von D₆-Cholesterol und D₆-Coprostanol addieren zu können, mussten diese aufgrund ihres unterschiedlichen Fragmentierungsverhaltens im Massenspektrometer wie von Lütjohann *et al.* (39) beschrieben mit Korrekturfaktoren multipliziert werden. Die individuellen Cholesterolresorptionsraten ergaben sich aus dem Mittelwert der vier Stuhlproben am Ende der jeweiligen Behandlungsperiode.

Die Bestimmung der Cholesterolsynthese erfolgte über die sogenannte *fecal balance*-Methode (131). Die Cholesterolsynthese wird dabei ermittelt, indem von der Summe der täglich mit dem Stuhl ausgeschiedenen neutralen und sauren Sterole (= *fecal balance*) das mit der Nahrung zugeführte Cholesterol subtrahiert wird. Die Analyse der neutralen Sterole (Cholesterol, Coprostanol, Coprostanon) und der sauren Sterole (die Gallensäuren Cholsäure, Chenodesoxycholsäure, Desoxycholsäure, Lithocholsäure und Ursodesoxycholsäure) erfolgte aus denselben Stuhlproben wie bei der Cholesterolresorptionsbestimmung und wurde mittels GC/FID nach der Methode von Czybayko (153) in leicht modifizierter Form durchgeführt. Es wurde das unter Kapitel 3.3.1 beschriebene GC/FID-System verwendet. Die Quantifizierung des *fecal flow markers* D₄-Sitostanol in dem eingesetzten Stuhlaliquot erfolgte mittels GC/MS. Zur Ermittlung der täglichen fäkalen Ausscheidung der Sterole wurden die Verhältnisse der neutralen und sauren Sterole zu D₄-Sitostanol in der Stuhlprobe mit der täglich eingenommenen Menge an D₄-Sitostanol multipliziert. Die mittlere täglich mit der Nahrung zugeführte Menge an natürlichem Cholesterol wurde anhand der von den Studienteilnehmern geführten Sieben-Tage-Ernährungsprotokolle ermittelt, die mit Hilfe des computergestützten Nährwertberechnungsprogramms PRODI (Version 4.5, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland) ausgewertet wurden. Die individuellen Cholesterolresorptionsraten ergaben sich aus dem Mittelwert der vier Stuhlproben am Ende der jeweiligen Behandlungsperiode.

4.4 Statistische Auswertung der klinischen Daten

Die statistische Analyse der Studiendaten wurde mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die gemessenen Konzentrationen der deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol in den Serumproben der Studienteilnehmer wurden dosiskorrigiert angegeben, das heißt um die vorliegenden Mengenverhältnisse der drei Sterole in der Kapsel korrigiert. Folgende statistische Variablen wurden aus den gemessenen Konzentrationen berechnet: Serumkonzentrationsquotienten Campesterol/Cholesterol, Sitosterol/Cholesterol, D₆-Campesterol/Cholesterol, D₆-Sitosterol/Cholesterol, D₆-Cholesterol/Cholesterol, D₆-Campesterol/Campesterol, D₆-Sitosterol/Sitosterol.

Für alle Variablen wurden die relativen und absoluten Änderungen in den einzelnen Medikationsphasen gegenüber der Placebophase ermittelt. Die Normalverteilung der Variablen unter den Medikationsphasen wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft. Normalver-

teilte Daten ($P > 0,05$) wurden als Mittelwert mit Standardabweichung ($MW \pm SD$) angegeben. Ausreißer wurden auf dem 99 %-Wahrscheinlichkeitsniveau mittels Grubbs-Test, der Normalverteilung voraussetzt, ermittelt (152). Ein Ausschluss von Daten eines Probanden oder von Einzelwerten erfolgte nur, wenn dies entsprechend begründet werden konnte (siehe Kapitel 5.2.1). Ausreißer, deren Ursache unklar war, wurden gekennzeichnet (siehe Anhang), aber nicht aus dem Datenset entfernt.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($MW \pm SD$) angegeben, um Ergebnisse zwischen Gruppen zu vergleichen. Der Einfluss der Medikation (4 Faktorstufen: Placebo, Ezetimib, Simvastatin, Simvastatin plus Ezetimib) wurde für jede Variable mittels Varianzanalyse überprüft. Im Fall eines signifikanten Ergebnisses der Varianzanalyse ($P \leq 0,05$), wurde durch einen gepaarten t-Test (zweiseitig) getestet, zwischen welchen Mittelwerten ein signifikanter Unterschied ($P \leq 0,05$) vorhanden war. Um festzustellen, ob ein Carry-Over-Effekt der deuterierten Sterole von einer in die nächste Behandlungsperiode aufgetreten war, wurde mittels Varianzanalyse der Einfluss der Behandlungsperiode (4 Faktorstufen: Behandlungsperiode 1, 2, 3 und 4) auf die Konzentrationen der deuterierten Sterole unter jeder der vier Medikationen untersucht.

Lineare Regressionsanalysen wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient r nach Pearson wurde bestimmt, um den Grad des linearen Zusammenhanges zwischen den Serumkonzentrationen und der Cholesterolresorption und -synthese zu beurteilen.

Generell wurden P -Werte kleiner als 0,001 nicht auf alle Kommastellen ausgeschrieben sondern mit $P < 0,001$ bezeichnet.

5 ERGEBNISSE

5.1 Methodenvalidierung

5.1.1 Selektivität

In **Abbildung 5.1** und **Abbildung 5.2** sind die GC/MS-SIM-Chromatogramme der derivatisierten Sterole aus einem Studienserum dargestellt. Die Analyse jedes Serumsterols erfolgte auf drei ausgewählten Ionenspuren (ein Quantifier-Ion und zwei Qualifier-Ionen). Die Verhältnisse der Peakflächen für die jeweils drei substanzspezifischen Ionen blieben für jedes Sterol in den Proben konstant und stimmten mit den Peakflächenverhältnissen der Reinsubstanzen überein. Die Retentionzeit betrug 15,08 min für D₆-Cholesterol (m/z 335), 15,20 min für Cholesterol (m/z 458), 17,29 min für D₆-Campesterol (m/z 388), 17,42 min für Campesterol (m/z 472), 19,07 min für D₆-Sitosterol (m/z 402) und 19,25 min für Sitosterol (m/z 486). Der interne Standard Epicoprostanol eluierte bereits nach 13,96 min und wurde nur auf einer Ionenspur (m/z 370) erfasst.

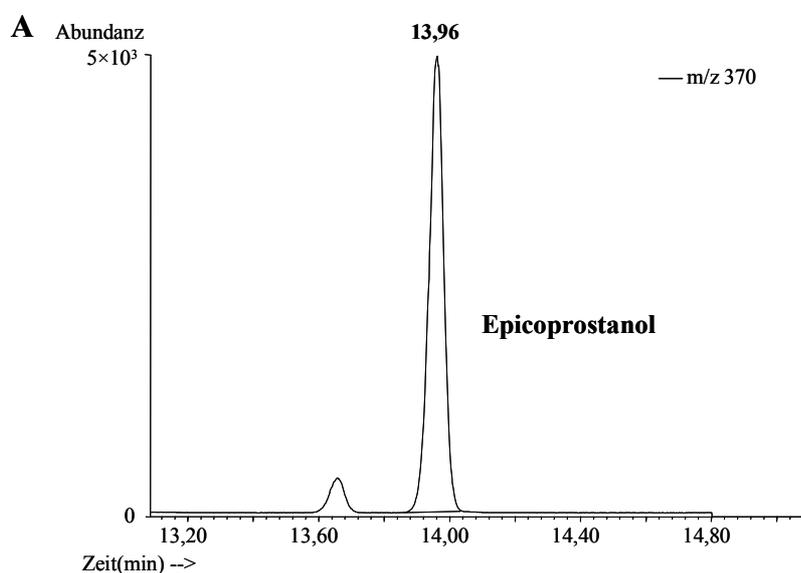


Abbildung 5.1 Repräsentative GC/MS-SIM-Chromatogramme der Trimethylsilylether von Epicoprostanol (interner Standard) (A), D₆-Cholesterol (B) und Cholesterol (C) aus einem Studienserum. Die Aufarbeitung der Serumproben für die GC/MS-Analyse von D₆-Cholesterol und Cholesterol erfolgte wie unter Kapitel 4.1.4.1 beschrieben. GC/MS-Analysebedingungen siehe Kapitel 4.1.4.2. Epicoprostanol wurde nur auf dem Quantifier-Ion erfasst. Für die Quantifizierung von D₆-Cholesterol und Cholesterol wurde der Peak des jeweiligen Quantifier-Ions (durchgezogene Linie) herangezogen. Die Peakflächen der Qualifier-Ionen (gestrichelte Linien) dienten dazu, die Identität der Substanz zu verifizieren.

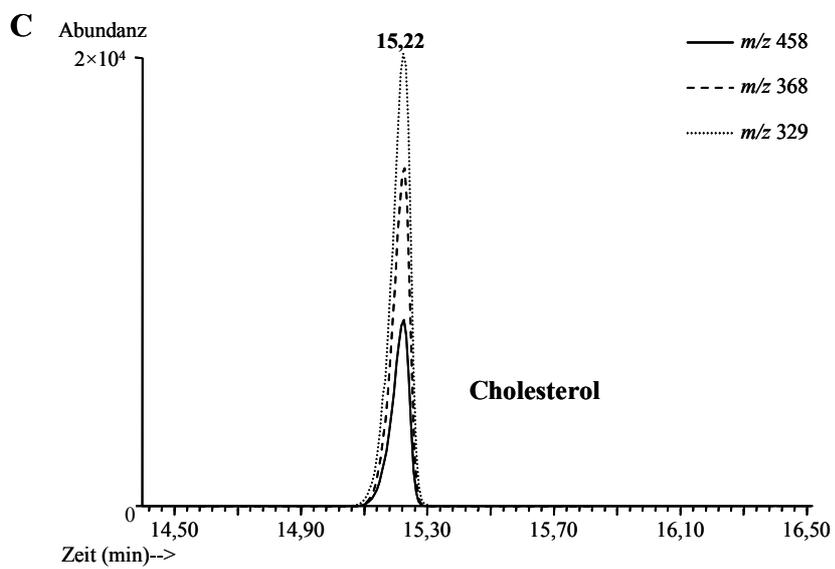
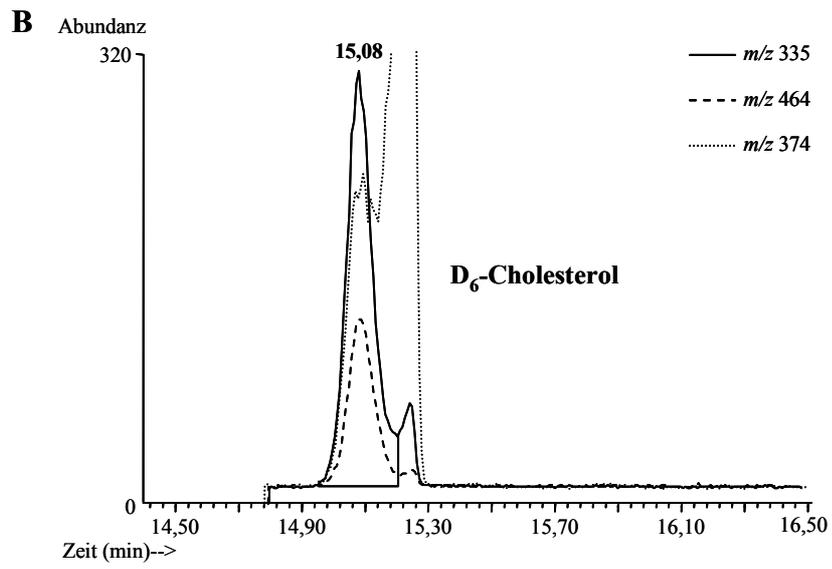


Abbildung 5.1 Fortsetzung

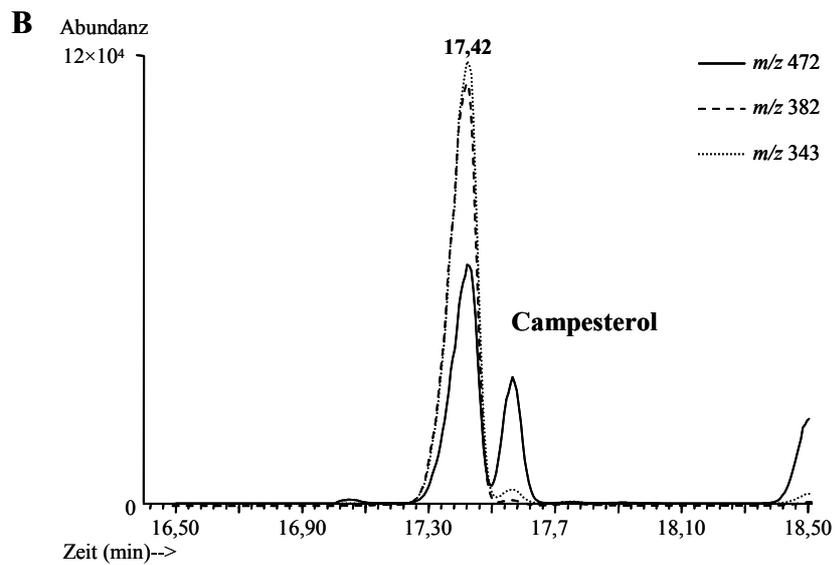
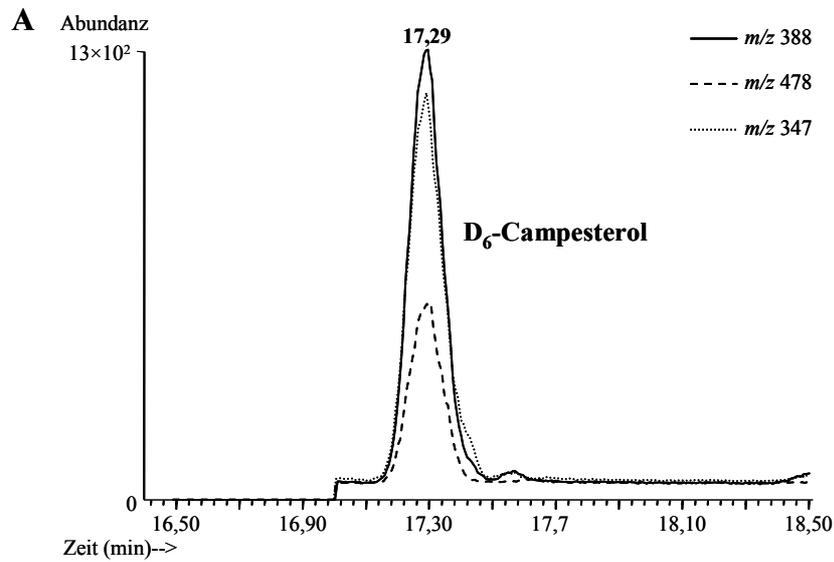


Abbildung 5.2 Repräsentative GC/MS-SIM-Chromatogramme der Trimethylsilylether von D₆-Campesterol (A) Campesterol (B), D₆-Sitosterol (C) und Sitosterol (D) aus einem Studienserum. Die GC/MS-Analyse (Analysebedingungen siehe Kapitel 4.1.3.4) erfolgte nach Abtrennung der Phytosterole mittels HPLC (siehe Kapitel 4.1.3). Für die Quantifizierung wurde der Peak des jeweiligen Quantifizier-Ions (durchgezogene Linie) herangezogen. Die Peakflächen der Qualifizier-Ionen (gestrichelte Linien) dienten dazu, die Identität der Substanz zu verifizieren.

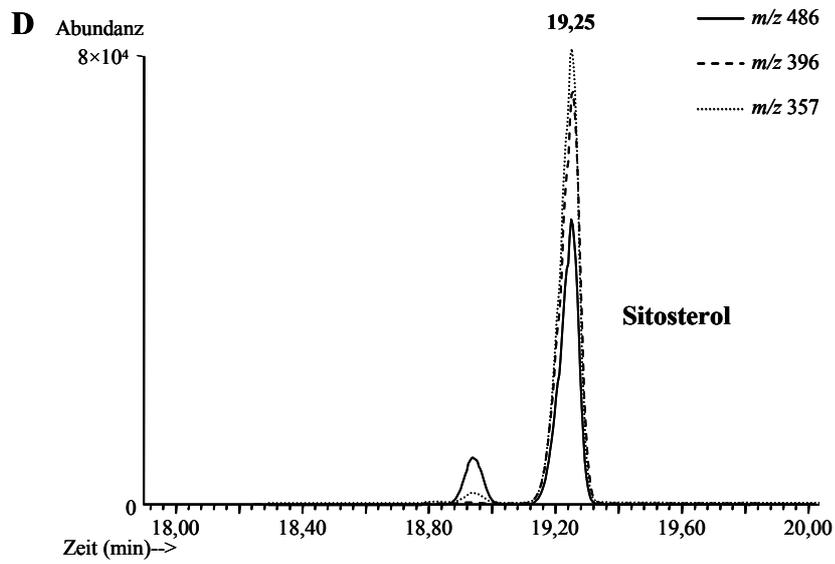
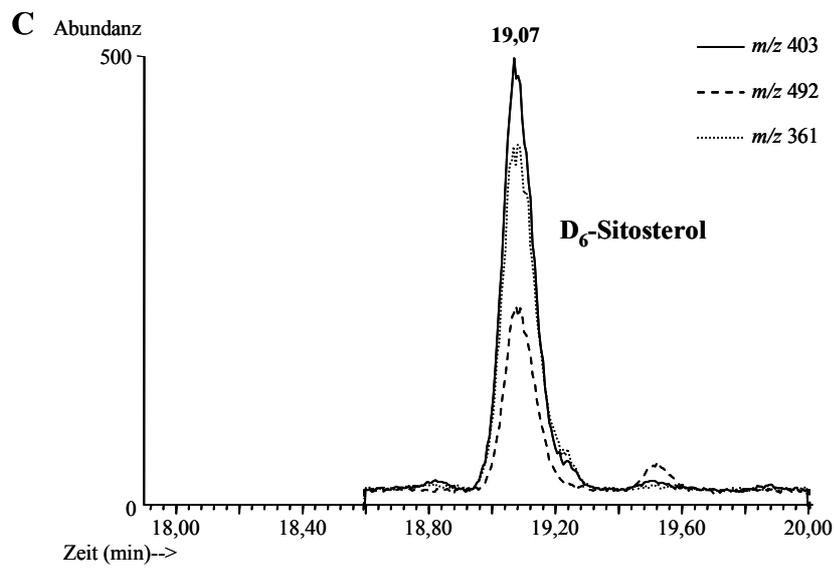


Abbildung 5.2 Fortsetzung

5.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der Methoden sind in **Tabelle 5.1** zusammengefasst. Die absoluten Nachweisgrenzen der neuen GC/MS-Methoden lagen für die deuterierten Sterole bei 3-6 pg und für die natürliche Phytosterole bei 8-9 pg. Die Nachweisgrenze bezogen auf die gesamte Methode betrug 7 µg/dl für D₆-Cholesterol. Für die deuterierten und natürlichen Phytosterole war das Nachweisvermögen mit Nachweisgrenzen zwischen 31 und 57 ng/dl deutlich höher. Für die Bestimmung von Cholesterol war eine Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze auf Basis des Signal/Rausch-Verhältnisses nicht relevant. Aufgrund der hohen Cholesterolkonzentration im Serum lag das Signal für Cholesterol stets ein Vielfaches über dem Rauschen. Die Bestimmungsgrenze für Cholesterol war damit durch die Konzentration des untersten Kalibrierpunktes (84 mg/dl) festgelegt.

Tabelle 5.1 Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen für die Methoden zur Analyse von deuterierten und natürlichen Serumsterolen

Sterol	Nachweisgrenze		Bestimmungsgrenze	
	(µg/dl)	(pg)	(µg/dl)	(pg)
<i>GC/MS-Methode</i>				
D ₆ -Cholesterol	7	2,8	21	8,4
<i>HPLC-GC/MS-Methode</i>				
D ₆ -Campesterol	0,031	4,7	0,093	14
D ₆ -Sitosterol	0,037	5,6	0,112	17
Campesterol	0,054	8,1	0,162	24
Sitosterol	0,057	8,6	0,172	26

5.1.3 Kalibrierung

Abbildung 5.3 zeigt exemplarisch die Kalibriergeraden für die natürlichen und deuterierten Sterole. Die optische Beurteilung und die linearen Regressionsanalysen bestätigten für die Sterole in den dargestellten Konzentrationsbereichen eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Signal: Die Bestimmtheitsmaße der Kalibriergeraden lagen alle über 0,997. Weiter waren die Steigungsparameter a der Geradengleichungen signifikant verschieden von Null ($P < 0,05$ für alle) und die Parameter b (y -Achsenabschnitt) – außer für die Kalibriergerade von Cholesterol – nicht signifikant verschieden von Null ($P > 0,05$ für alle außer Cholesterol). Die Kalibriergerade für Cholesterol wies einen negativen y -Achsenabschnitt b auf, der sich statistisch signifikant von Null unterschied. Die Ursache hierfür war, dass über den gesamten Konzentrationsbereich von 0-363 mg/dl zunächst eine quadratische Regression die bessere Kurvenanpassung bot. Das heißt, die Kalibrierkurve neigte sich vor dem Erreichen des Koordinatenursprungs der x -Achse zu (Daten nicht dargestellt). Da für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Serumproben jedoch keine Cholesterolkonzentrationen unter 80 mg/dl zu erwarten waren, wurde die Regressionsanalyse auf den Konzentrationsbereich von 84-363 mg/dl eingegrenzt. Dadurch konnte der quadratische Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal durch einen einfacheren linearen Zusammenhang angenähert werden (lokale Linearisierung), so dass einfachere Rechenverfahren bei der Regressionsanalyse eingesetzt werden konnten. **Tabelle 5.2** gibt die linearen Bereiche, linearen Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße der Kalibriergeraden wieder.

Tabelle 5.2 Linearer Bereich, lineare Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß B für die Kalibriergeraden zur Quantifizierung der deuterierten und natürlichen Sterole im Serum

Sterol	Linearer Bereich	Lineare Geradengleichung	B
GC/MS-Methode			
D ₆ -Cholesterol	0-0,449 mg/dl	$y = 0,308 x - 0,001$	0,9993
Cholesterol	84-363 mg/dl	$y = 0,199 x - 6,158$	0,9988
HPLC-GC/MS-Methode			
D ₆ -Campesterol	0-27,80 µg/dl	$y = 0,002 x - 0,0001$	0,9994
D ₆ -Sitosterol	0-16,76 µg/dl	$y = 0,002 x - 0,0004$	0,9974
Campesterol	0-0,690 mg/dl	$y = 1,615 x - 0,013$	0,9976
Sitosterol	0-0,460 mg/dl	$y = 1,410 x - 0,006$	0,9975

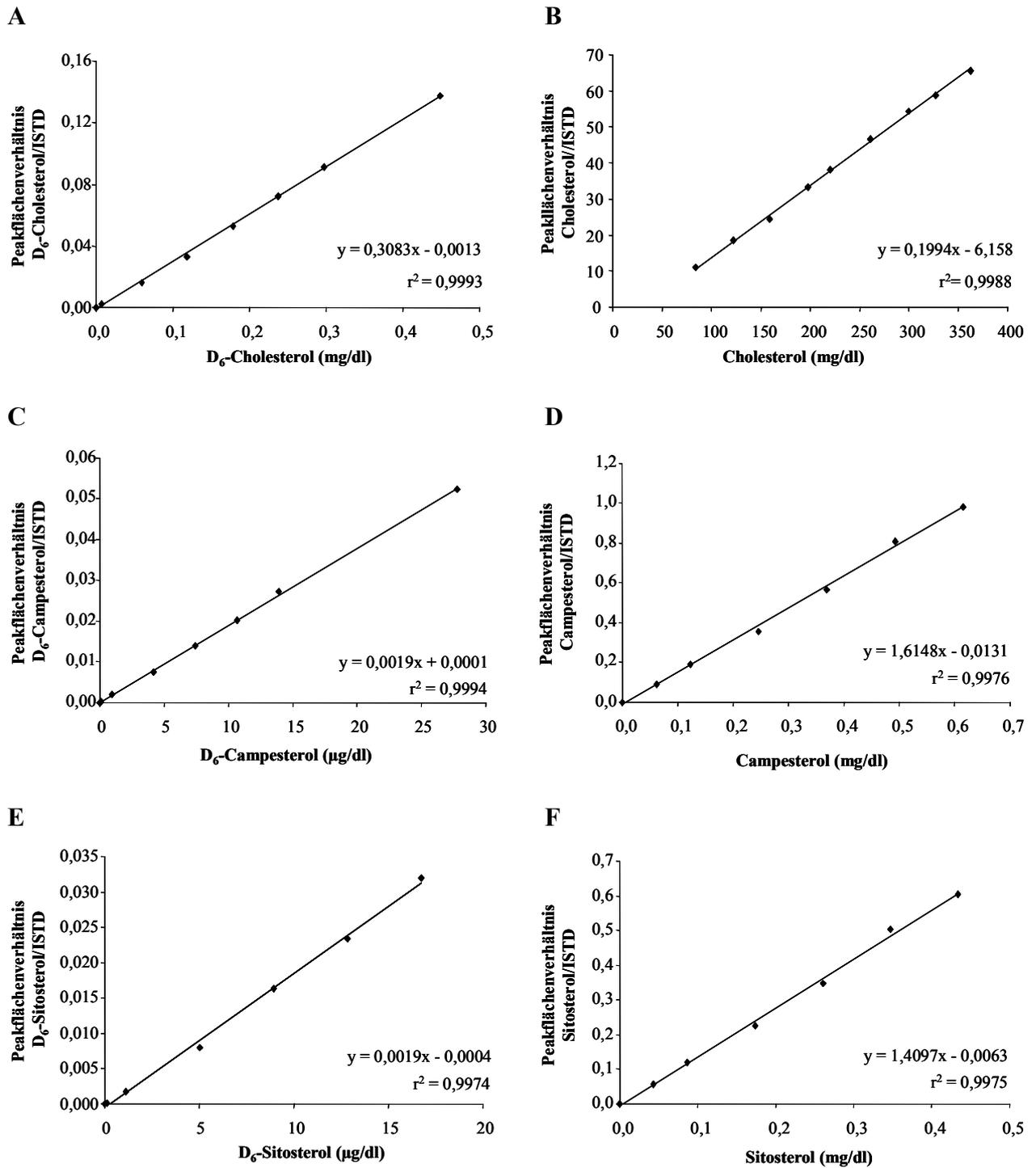


Abbildung 5.3 Kalibriergeraden mit linearen Regressionsgleichungen und Bestimmtheitsmaß ($B = r^2$) für D₆-Cholesterol (A), Cholesterol (B), D₆-Campesterol (C), Campesterol (D), D₆-Sitosterol (E) und Sitosterol (F).

5.1.4 Präzision und Richtigkeit

Als Maß für die Inter-Assay-Präzision sind die Variationkoeffizienten für die Sterolkonzentrationen in den Kontrollseren in **Tabelle 5.3** zusammengestellt. Sie lagen für alle Sterole unter den von der FDA geforderten 15 %. Die GC/MS-Methode zur Bestimmung von deuteriertem und natürlichem Cholesterol wies deutlich geringere Variationskoeffizienten (5,5 % für D₆-Cholesterol und 4,9 % für Cholesterol) und somit eine höhere Inter-Assay-Präzision auf als die HPLC-GC/MS-Methode zur Bestimmung der deuterierten und natürlichen pflanzlichen Sterole (Variationskoeffizienten im Bereich von 10,7 % bis 12,5 %).

Die Variationskoeffizienten der Sechsfachbestimmungen als Maß für die Intra-Assay-Präzision lagen bei allen sechs Sterolen für die mittleren und hohen Konzentrationslevel in einem Bereich von 1,3 bis 8,7 % (**Tabelle 5.4**). Die Bestimmung der niedrigsten Konzentration war bei allen Sterolen mit Ausnahme von Cholesterol (2,6 %) mit der größten Schwankung behaftet (zwischen 7,3 % und 15,5 %). Die Variationskoeffizienten lagen damit in dem von der FDA festgelegten Akzeptanzbereich.

Die Werte für die Richtigkeit (**Tabelle 5.4**) lagen für alle Sterole und Konzentrationsstufen in einem Bereich von 88,5 bis 115 % und erfüllten damit die von der FDA geforderten Kriterien. Für den Großteil der Bestimmungen wichen die Richtigkeitswerte weniger als 10 % von dem Idealwert (100 %) ab. Ausnahmen waren nur D₆-Cholesterol in Konzentrationsstufe 3 (115,0 %) und D₆-Campesterol in Konzentrationsstufe 2 (111,3 %).

Tabelle 5.3 Inter-Assay-Präzision für die Methoden zur Analyse von deuterierten und natürlichen Serumsterolen

Sterol	Gemessene Konzentration (MW ± SD)	Variationskoeffizient (%)	Anzahl der Serien
GC/MS-Methode			
D ₆ -Cholesterol (mg/dl)	0,119 ± 0,007	5,5	6
Cholesterol (mg/dl)	186 ± 9	4,9	6
HPLC-GC/MS-Methode			
D ₆ -Campesterol (µg/dl)	7,38 ± 0,91	12,3	7
D ₆ -Sitosterol (µg/dl)	2,17 ± 0,27	12,5	7
Campesterol (mg/dl)	0,365 ± 0,044	12,2	7
Sitosterol (mg/dl)	0,219 ± 0,024	10,7	7

Tabelle 5.4 Intra-Assay-Präzision und Richtigkeit für die Methoden zur Analyse von deuterierten und natürlichen Serumsterolen

Zugesetzte Sterolkonzentration	Soll-Konzentration	Gemessene Konzentration (MW ± SD; n = 6)	Intra-Assay-Präzision (%)	Richtigkeit (%)
GC/MS-Methode				
D ₆ -Cholesterol (mg/dl)				
0,059	0,059	0,056 ± 0,006	9,8	94,7
0,119	0,119	0,113 ± 0,006	5,5	94,8
0,238	0,238	0,273 ± 0,024	8,9	115,0
			MW ± SD	101,5 ± 11,7
Cholesterol (mg/dl)				
0		23 ± 2		
84	107	104 ± 3	2,6	97,6
198	221	213 ± 3 ^{a)}	1,3	96,6
327	350	372 ± 32	8,7	106,3
			MW ± SD	100,2 ± 5,3
HPLC-GC/MS-Methode				
D ₆ -Campesterol (µg/dl)				
0,278	0,278	0,289 ± 0,045	15,5	104,0
4,170	4,170	3,692 ± 0,260	7,0	88,5
7,414	7,414	7,198 ± 0,500	6,9	97,1
18,54	18,54	17,99 ± 1,384	7,7	97,0
			MW ± SD	96,7 ± 6,3
D ₆ -Sitosterol (µg/dl)				
0,335	0,335	0,354 ± 0,042	11,8	105,7
5,028	5,028	4,567 ± 0,288	6,3	90,8
8,939	8,939	8,861 ± 0,566	6,4	99,1
22,35	22,35	22,05 ± 1,615	7,3	98,7
			MW ± SD	98,6 ± 6,1
Campesterol (mg/dl)				
0		0,047 ± 0,007		
0,043	0,090	0,084 ± 0,007	8,2	92,6
0,163	0,210	0,205 ± 0,014	7,1	97,4
0,338	0,385	0,391 ± 0,021	5,5	101,4
0,680	0,727	0,705 ± 0,046 ^{b)}	6,5	97,0
			MW ± SD	97,1 ± 3,6
Sitosterol (mg/dl)				
0		0,031 ± 0,005		
0,053	0,084	0,084 ± 0,006	7,3	100,3
0,204	0,236	0,238 ± 0,017	7,0	101,0
0,422	0,453	0,481 ± 0,026	5,4	106,1
0,854	0,885	0,880 ± 0,055 ^{b)}	6,3	99,4
			MW ± SD	101,7 ± 3,0

^{a)} Stichprobenumfang n = 5 nach Entfernung eines Ausreißers auf Basis des Testverfahrens nach Dixon

^{b)} außerhalb des Arbeitsbereichs der Kalibriergeraden bestimmt

5.2 Klinische Studie

5.2.1 Datenscreening

Die individuellen Serumkonzentrationen für die deuterierten und natürlichen Sterole, die Cholesterolresorptionsraten und Cholesterolsyntheseraten der 37 Studienteilnehmer sind im Anhang aufgelistet. Die Cholesterolsyntheserate der Studienteilnehmer unter der Behandlung mit Simvastatin und unter Simvastatin plus Ezetimib und der Serumkonzentrationsquotient D₆-Campesterol/Campesterol unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib waren nicht normalverteilt ($P \leq 0,031$ für alle). Der Ausreißertest wurde auf diese Variablen unter Placebo angewandt, da hier noch kein Einfluss der Medikation vorhanden war. Es wurden nur Ausreißer bei der Cholesterolsyntheserate ermittelt: AN 203 (3895 mg/d), AN 212 (3232 mg/d), AN 222 (3160 mg/d) und AN 239 (2004 mg/d). Die Daten dieser vier Probanden (AN 203, 212, 222 und 239) wurden bei der Datenanalyse nicht berücksichtigt, da aufgrund der folgenden Punkte davon auszugehen war, dass diese Studienteilnehmer das Studienprotokoll nicht eingehalten hatten:

(a) Messwiederholungen bestätigten die hohen Synthesewerte, so dass Messfehler als Ursache für die Ausreißer mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnten. (b) Die hohen Cholesterolsyntheseraten sind unter physiologischen Bedingungen kaum zu erreichen. Die höchste mit derselben Methode bestimmte Cholesterolsyntheserate bei Hypercholesterolemiepatienten lag bei Lindenthal *et al.* (154) bei 1790 mg/d. (c) Die Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole waren insbesondere bei den Studienteilnehmern AN 203 und AN 212 in allen Behandlungsphasen sehr niedrig. (d) Die auf Basis bisheriger wissenschaftlicher Erkenntnisse zu erwartenden Änderungen der Cholesterolsyntheserate in den weiteren Medikationsphasen (Erhöhung unter Ezetimib, Senkung unter Simvastatin und eine in der Tendenz additive Wirkung der beiden Medikamente unter Simvastatin plus Ezetimib), die sich bei den anderen Studienteilnehmern zeigten, waren bei diesen vier Probanden nicht zu beobachten. (e) Zur weiteren Ursachenabklärung wurden die LDL-Cholesterolkonzentrationen herangezogen. Unter Simvastatin und Ezetimib wurden diese bei allen vier Probanden erwartungsgemäß gesenkt und unter Simvastatin plus Ezetimib zeigte sich auch die additive Wirkung auf die LDL-Cholesterolkonzentration. Eine fehlerhafte Einnahme der Medikation als Ursache für die erhöhten Cholesterolsynthesewerte war daher unwahrscheinlich.

Diese Punkte untermauerten die Vermutung, dass hier nicht Messfehler, physiologische Gründe oder fehlerhafte Medikamenteneinnahme die Ursache für die hohen Cholesterolsynthesewerte waren, sondern vielmehr davon auszugehen ist, dass die Markerkapseln von diesen Studienteilnehmern nicht vollständig eingenommen wurden. Letzteres hat zur Folge, dass die *fecal balance*, das heißt, die Summe der täglich ausgeschiedenen Menge an neutralen Sterolen und Gallensäuren, und damit auch die daraus berechnete Cholesterolsyntheserate zu hoch ausfallen. Möglicherweise hat auch eine fehlerhafte Führung des Ernährungsprotokolls (keine vollständige Nennung aller verzehrten Lebensmittel) zu einer zu niedrig angenommenen exogene Cholesterolzufuhr geführt und in Folge dessen zu einer zu hoch berechneten Cholesterolsynthese beigetragen.

Nach Ausschluss der Daten der vier Studienteilnehmer lagen damit in jeder der vier Behandlungsphasen Werte von 33 Probanden vor, die nun bis auf eine Ausnahme (Quotient D₆-Campesterol/Campesterol) alle normalverteilt ($P > 0,05$) waren. Der Quotient D₆-Campesterol/Campesterol wies weiterhin sowohl in der Ezetimib- ($P = 0,011$) als auch Simvastatin plus Ezetimib-Phase ($P = 0,0002$) keine Normalverteilung auf. Als Ursache waren hier die extrem hohen Quotienten von Proband AN 214 (185 µg/mg unter Simvastatin plus Ezetimib und 81 µg/mg unter Ezetimib) zu sehen, die aufgrund der größeren Messungenauigkeit im unteren Konzentrationsbereich, in dem D₆- und D₀-Campesterol unter Simvastatin plus Ezetimib und Ezetimib jeweils bestimmt worden waren, zustande gekommen waren. Ein Ausschluss der beiden einzelnen Quotienten führte zu einer Normalverteilung des Quotienten sowohl in der Ezetimib- als auch in der Simvastatin-plus-Ezetimib-Phase. Weitere statistisch ermittelte Ausreißer für die Variablen unter Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib wurden nur gekennzeichnet (siehe Anhang), jedoch in die Datenanalyse miteinbezogen, da hier die Ursachen nicht klar definiert werden konnten.

5.2.2 Cholesterolesorption und Cholesterolsynthese

Das Design der klinischen Studie war ursprünglich darauf ausgerichtet, die Wirkung von Ezetimib und Simvastatin – jeweils allein und in Kombination verabreicht – auf die Cholesterolesorption und -synthese zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit richtet sich der Fokus hingegen auf die Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole und deren Zusammenhang mit der Cholesterolesorption. Zum besseren Verständnis werden daher im Folgenden auch die Ergebnisse zur Wirkung der Medikamente auf die Cholesterolesorption und Cholesterolsynthese dargestellt.

Abbildung 5.4 veranschaulicht die mittlere Änderung der Cholesterolesorptionsrate der 33 Studienteilnehmer in der Behandlungsphase mit Simvastatin, Ezetimib sowie Simvastatin plus Ezetimib gegenüber der Behandlung mit Placebo. Unter Placebo betrug die mittels der *continuous feeding dual stable isotope method* über Stuhlproben bestimmte Cholesterolesorption der Studienteilnehmer im Durchschnitt $50,0 \pm 9,6$ % (Spannbreite 25,9 % bis 66,5 %). Unter Simvastatin stieg sie gegenüber Placebo leicht (im Mittel +7 %), aber nicht signifikant ($P = 0,051$), auf $52,4 \pm 8,7$ % (Spannbreite 34,7 % bis 67,9 %) an. Ezetimib senkte die Cholesterolesorptionsrate signifikant (im Mittel -57 %, $P < 0,001$ versus Placebo) auf $21,3 \pm 10,9$ % (Spannbreite 2,0 % bis 40,4 %). Unter der Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib wurde sie signifikant im Mittel um -52 % gegenüber Placebo ($P < 0,001$) auf $23,5 \pm 10,1$ % (Spannbreite 4,4 % bis 40,5 %) gesenkt.

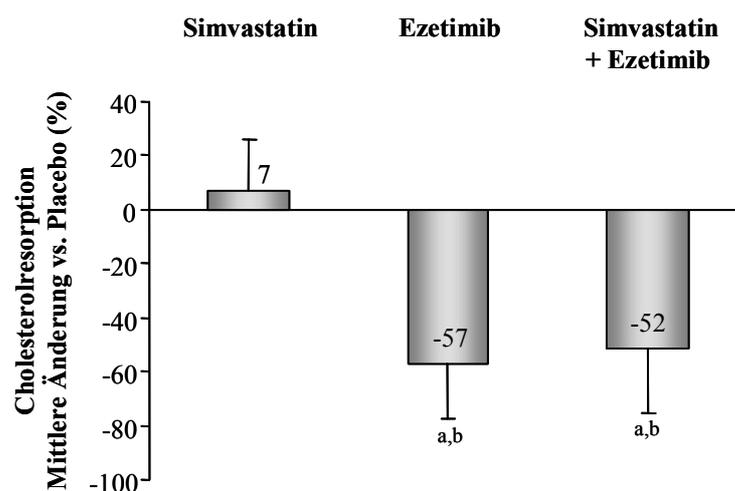


Abbildung 5.4 Mittlere prozentuale Änderung der Cholesterolesorption gegenüber Placebo bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach jeweils siebenwöchiger Behandlung mit Simvastatin (20 mg/d), Ezetimib (10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (20/10 mg/d). Säulen mit Fehlerbalken entsprechen MW \pm SD. ^asignifikant verschieden von Placebo ($P < 0,001$); ^bsignifikant verschieden von Simvastatin ($P < 0,001$).

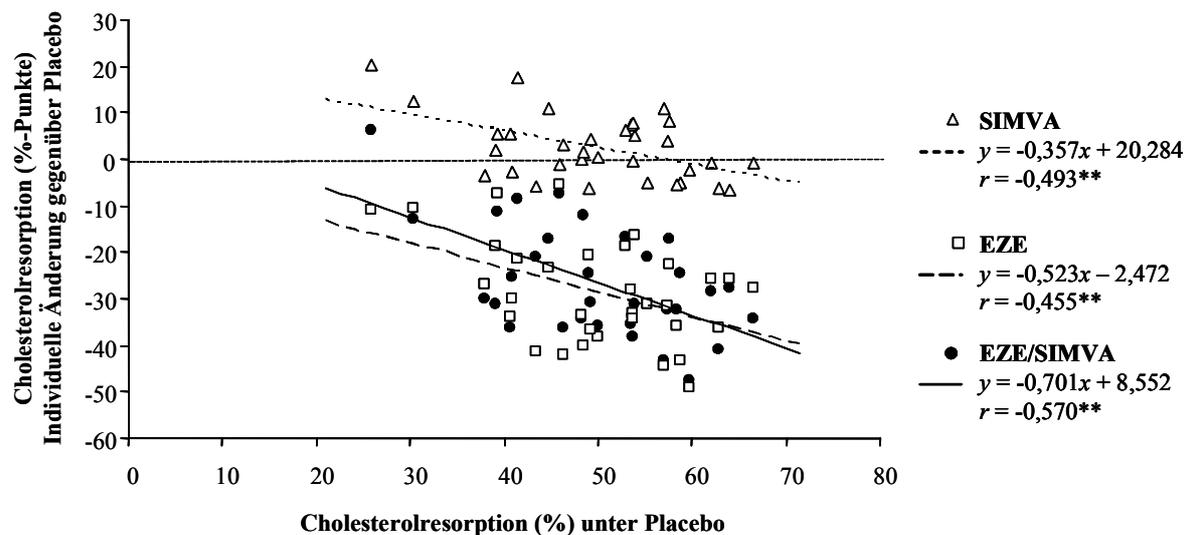


Abbildung 5.5 Individuelle absolute Änderungen der Cholesterolresorptionsrate (in %-Punkten) gegenüber Placebo bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach jeweils siebenwöchiger Behandlung mit Simvastatin (Δ SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (\square EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (\bullet SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Die Änderungen sind dargestellt in Anhängigkeit von der Cholesterolresorptionsrate (%) unter Placebo. Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch ** ($P < 0,01$).

Abbildung 5.5 stellt die individuellen absoluten Änderungen der Cholesterolresorption in den Behandlungsphasen gegenüber Placebo dar. Auf die Simvastatin-Behandlung reagierten 15 der 33 Studienteilnehmer mit einem Abfall der Cholesterolresorption im Bereich von -0,01 bis -7 Prozentpunkten (-0,02 % bis -10 %); bei den restlichen 18 Studienteilnehmern kam es zu einem Anstieg der Cholesterolresorption in einem Bereich von 0,4 bis 20,4 Prozentpunkte (+1 % bis +79 %). Es zeigte sich dabei, dass die Studienteilnehmer mit niedrigen Cholesterolresorptionsraten unter Placebo eher mit einem Anstieg und diejenigen mit hohen Cholesterolresorptionsraten unter Placebo eher mit einem Abfall der Cholesterolresorption unter Simvastatin reagierten ($r = -0,493$; $P = 0,004$). Dieser Zusammenhang bestand auch für die prozentualen Änderungen ($r = -0,578$; $P < 0,001$; Daten nicht dargestellt). Ezetimib senkte die Cholesterolresorptionsrate bei allen Studienteilnehmern im Bereich von -6 bis -49 Prozentpunkten (-12 % bis -82 %). Dies galt mit einer Ausnahme (+6 Prozentpunkte (+24 %)) für AN 227) auch für die Behandlung mit Simvastatin plus Ezetimib (Spannbreite -8 bis -47 Prozentpunkte; -16 % bis -79 %). Dabei war zu beobachten, dass je höher die Cholesterolresorptionsrate eines Studienteilnehmers unter Placebo war, desto größer war der Betrag, um den sie unter der Behandlung mit Ezetimib und auch Simvastatin plus Ezetimib gesenkt wurde (Ezeti-

mib: $r = -0,455$, $P = 0,008$; Simvastatin plus Ezetimib: $r = -0,570$, $P = 0,001$). Für die prozentualen Änderungen bestand dieser Zusammenhang nicht (Ezetimib: $r = -0,028$, $P = 0,877$; Simvastatin plus Ezetimib: $r = -0,260$, $P = 0,143$; Daten nicht dargestellt).

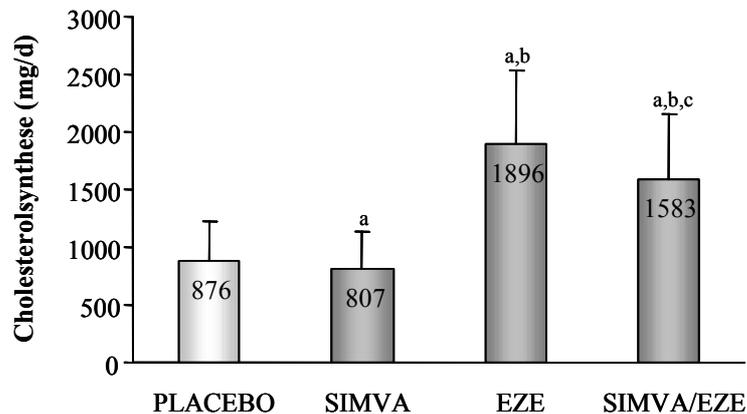


Abbildung 5.6 Mittlere tägliche Cholesterolsynthese (mg/d) bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach jeweils siebenwöchiger Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Säulen mit Fehlerbalken entsprechen MW + SD. ^asignifikant verschieden von Placebo ($P < 0,05$), ^bsignifikant verschieden von SIMVA ($P < 0,001$), ^csignifikant verschieden von EZE ($P = 0,002$).

In **Abbildung 5.6** sind die mittleren Cholesterolsyntheseraten der 33 Studienteilnehmer unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib dargestellt. Unter Placebo betrug die Cholesterolsyntheserate durchschnittlich 876 ± 342 mg/d. Unter Simvastatin wurde sie signifikant gesenkt auf 807 ± 338 mg/d ($P = 0,047$) und unter der Behandlung mit Ezetimib stieg sie signifikant auf 1896 ± 642 mg/d an gegenüber Placebo ($P < 0,001$). Während der kombinierten Gabe von Simvastatin plus Ezetimib lag die Cholesterolsynthese mit 1583 ± 576 mg/d signifikant niedriger als unter der Monotherapie mit Ezetimib ($P = 0,002$), aber immer noch signifikant höher als unter Placebo ($P < 0,001$).

Die durchschnittliche Cholesterolfuhr der Studienteilnehmer änderte sich zwischen den Behandlungsphasen nicht signifikant (Varianzanalyse mit $P = 0,805$).

5.2.3 Serumsterole

5.2.3.1 Natürliche Serumsterole

Tabelle 5.5 gibt die Serumkonzentrationen der natürlichen Sterole nach der Behandlung mit Placebo, Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib wider. Die prozentualen Änderungen der Serumkonzentrationen in den Behandlungsphasen gegenüber Placebo sind für die natürlichen Sterole in **Abbildung 5.7** dargestellt. Die Cholesterolkonzentration im Serum der Studienteilnehmer lag nach der Behandlung mit Placebo bei durchschnittlich 253 ± 39 mg/dl. Durch die Behandlung mit Simvastatin, Ezetimib sowie Simvastatin plus Ezetimib wurde sie jeweils signifikant vermindert ($P < 0,001$ für alle gegenüber Placebo). Durch Simvastatin wurde sie im Mittel um -28 % und durch Ezetimib im Mittel um -14 % gesenkt. Die Kombinationsgabe von Simvastatin und Ezetimib führte mit durchschnittlich -40 % zur stärksten Cholesterolsenkung. Die mittlere Serumkonzentration der Phytosterole betrug nach der Placebo-Phase $0,559 \pm 0,291$ mg/dl für Campesterol und $0,318 \pm 0,122$ mg/dl für Sitosterol. Simvastatin veränderte die Phytosterolkonzentrationen nicht signifikant gegenüber Placebo. Ezetimib senkte die Campesterol- und Sitosterolkonzentration hingegen signifikant um im Mittel -68 % bzw. -59 % gegenüber Placebo ($P < 0,001$ für beide).

Tabelle 5.5 Mittlere Serumkonzentration von Cholesterol und den Phytosterolen Campesterol und Sitosterol (absolut und im Verhältnis zu Cholesterol) im Serum von 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach jeweils siebenwöchiger Behandlung mit Placebo, Simvastatin (20 mg/d), Ezetimib (10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (20/10 mg/d)

	Placebo	Simvastatin	Ezetimib	Simvastatin plus Ezetimib
<i>Serumkonzentration</i>				
Cholesterol	253 ± 39	180 ± 30^a	$215 \pm 39^{a,b}$	$152 \pm 27^{a,b,c}$
Campesterol	$0,559 \pm 0,291$	$0,518 \pm 0,237$	$0,168 \pm 0,082^{a,b}$	$0,144 \pm 0,076^{a,b,c}$
Sitosterol	$0,318 \pm 0,122$	$0,296 \pm 0,119$	$0,123 \pm 0,041^{a,b}$	$0,111 \pm 0,048^{a,b,c}$
<i>Konzentrationsquotient</i>				
Campesterol/Cholesterol	$2,213 \pm 1,098$	$2,875 \pm 1,294^a$	$0,787 \pm 0,390^{a,b}$	$0,946 \pm 0,457^{a,b,c}$
Sitosterol/Cholesterol	$1,261 \pm 0,468$	$1,652 \pm 0,655^a$	$0,580 \pm 0,197^{a,b}$	$0,735 \pm 0,291^{a,b,c}$

Mittelwert \pm Standardabweichung

^a signifikant verschieden von Placebo ($P \leq 0,001$)

^b signifikant verschieden von Simvastatin ($P \leq 0,001$)

^c signifikant verschieden von Ezetimib ($P \leq 0,05$)

Die Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib führte zur stärksten Senkung der Serumkonzentrationen von Campesterol (-72%) und Sitosterol (-63 %) gegenüber Placebo ($P < 0,001$ für beide).

Die Phytosterolkonzentrationen wurden auch im Verhältnis zur Cholesterolkonzentration ausgedrückt, um Einflussfaktoren, die die Lipoproteinkonzentration und damit die Phytosterolkonzentration im Serum verändern, zu eliminieren (50). Die Quotienten Campesterol/Cholesterol und Sitosterol/Cholesterol wurden durch Simvastatin signifikant (im Mittel um 39 % bzw. 35 %) erhöht und unter Ezetimib signifikant (im Mittel um -62 % bzw. -51 %) vermindert gegenüber Placebo ($P < 0,001$ für alle). Die Kombinationsgabe von Simvastatin plus Ezetimib senkte den Campesterol/Cholesterol-Quotient um durchschnittlich -54 % und den Sitosterol/Cholesterol-Quotienten um durchschnittlich -38 % gegenüber Placebo ($P \leq 0,001$ für alle).

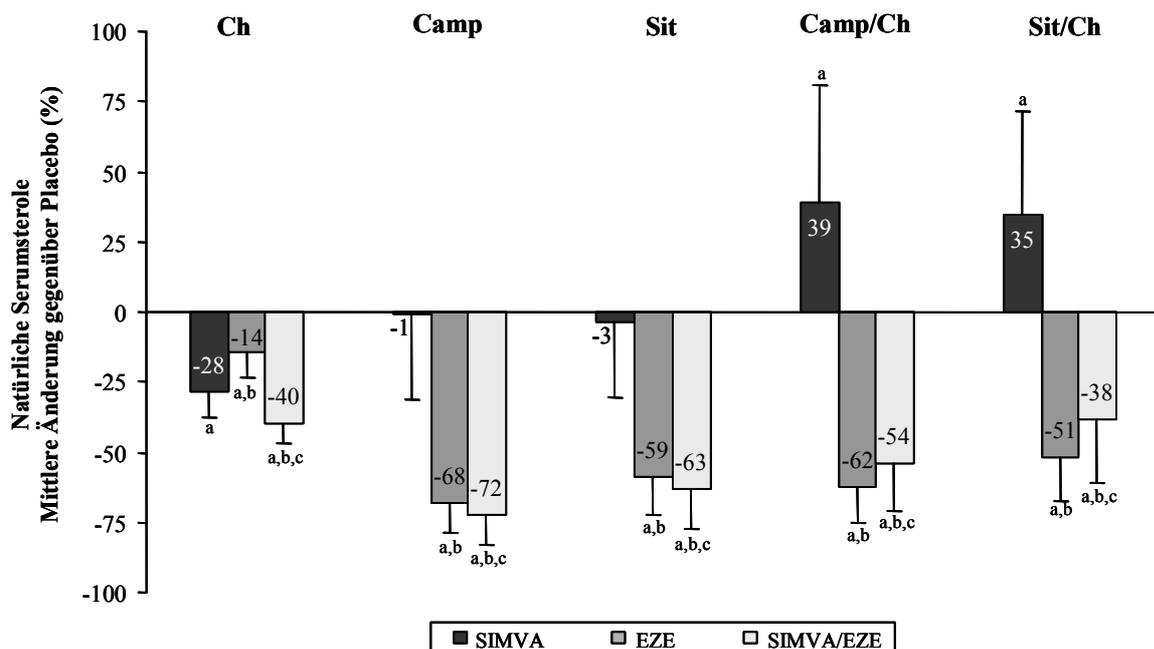


Abbildung 5.7 Mittlere prozentuale Änderung der absoluten Serumkonzentration von Cholesterol (Ch) und der absoluten und cholesterol-standardisierten Serumkonzentration von Campesterol (Camp) und Sitosterol (Sit) gegenüber Placebo bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach Behandlung mit Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Säulen mit Fehlerbalken entsprechen $MW \pm SD$. ^a signifikant verschieden von Placebo ($P < 0,05$); ^b signifikant verschieden von SIMVA ($P < 0,001$); ^c signifikant verschieden von EZE ($P < 0,05$).

5.2.3.2 Deuterierte Serumsterole

In **Tabelle 5.6** sind die mittleren Serumkonzentrationen von D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol im Serum der Studienteilnehmer nach der Behandlung mit Placebo, Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib zusammengefasst. **Abbildung 5.8** zeigt die mittleren prozentualen Änderungen der deuterierten Serumsterole in den Behandlungsphasen gegenüber Placebo. Nach einwöchiger oraler Einnahme der deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol unter der Behandlung mit Placebo betrug die mittlere D₆-Cholesterolkonzentration im Serum der Studienteilnehmer $70,4 \pm 21,7$ µg/dl, die D₆-Campesterolkonzentration $9,44 \pm 3,56$ µg/dl und die D₆-Sitosterolkonzentration $2,30 \pm 0,89$ µg/dl. Die Serumkonzentration von D₆-Cholesterol war nach oraler Gabe unter der Behandlung mit Simvastatin signifikant und um durchschnittlich -23 % niedriger als unter Placebo ($P < 0,001$). Auch die Serumkonzentrationen von D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol wurden unter Simvastatin leicht vermindert gegenüber Placebo, der Unterschied war aber nur für D₆-Campesterol signifikant (-6 %, $P = 0,014$). Nach der Behandlung mit Ezetimib waren die Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole signifikant und im Mittel um -59 % (D₆-Cholesterol), -66 % (D₆-Campesterol) und -61 % (D₆-Sitosterol) niedriger gegenüber Placebo ($P < 0,001$ für alle).

Tabelle 5.6 Mittlere Serumkonzentration der oral verabreichten deuterierten Sterole (absolut und als Quotient zur Konzentration von natürlichem Cholesterol) im Serum von 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (20 mg/d), Ezetimib (10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (20/10 mg/d).

	Placebo	Simvastatin	Ezetimib	Simvastatin plus Ezetimib
<i>Serumkonzentration</i>				
<i>Konzentrationsquotient</i>				

Mittelwert ± Standardabweichung

^a signifikant verschieden von Placebo ($P < 0,05$)

^b signifikant verschieden von Simvastatin ($P < 0,001$);

^c signifikant verschieden von Ezetimib ($P < 0,05$)

Die Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib führte zu durchschnittlich -68 % (D₆-Cholesterol), -71 % (D₆-Campesterol) und -66 % (D₆-Sitosterol) niedrigeren Serumkonzentrationen gegenüber Placebo ($P < 0,001$ für alle) und damit zu einer signifikant stärkeren Senkung der deuterierten Sterole als die Monotherapie mit Ezetimib (**Abbildung 5.8**).

Der D₆-Cholesterol/Cholesterol-Quotient stieg unter Simvastatin leicht (+7 %, $P = 0,037$) gegenüber Placebo an. Die D₆-Campesterol/Cholesterol- und D₆-Sitosterol/Cholesterol-Quotienten wurden signifikant und im Mittel um +31 % bzw. +40 % erhöht gegenüber Placebo ($P < 0,001$ für beide). Unter Ezetimib waren alle drei Quotienten signifikant vermindert gegenüber Placebo (-52 % für D₆-Cholesterol/Cholesterol, -60 % für D₆-Campesterol/Cholesterol und -54 % für D₆-Sitosterol/Cholesterol; $P < 0,001$ für alle). Unter Simvastatin plus Ezetimib wurden die D₆-Phytosterol/Cholesterol-Quotienten weniger stark gesenkt (-51 % für D₆-Campesterol/Cholesterol und -43 % für D₆-Sitosterol/Cholesterol; $P < 0,001$ für beide gegenüber Placebo) als unter der Monotherapie mit Ezetimib. Der D₆-Cholesterol/Cholesterol-Quotient wurde unter Kombinationstherapie mit Simvastatin und Ezetimib um durchschnittlich -47 % ($P < 0,001$ versus Placebo) vermindert, was vergleichbar war mit der Senkung unter Ezetimib-Monotherapie (**Abbildung 5.8**).

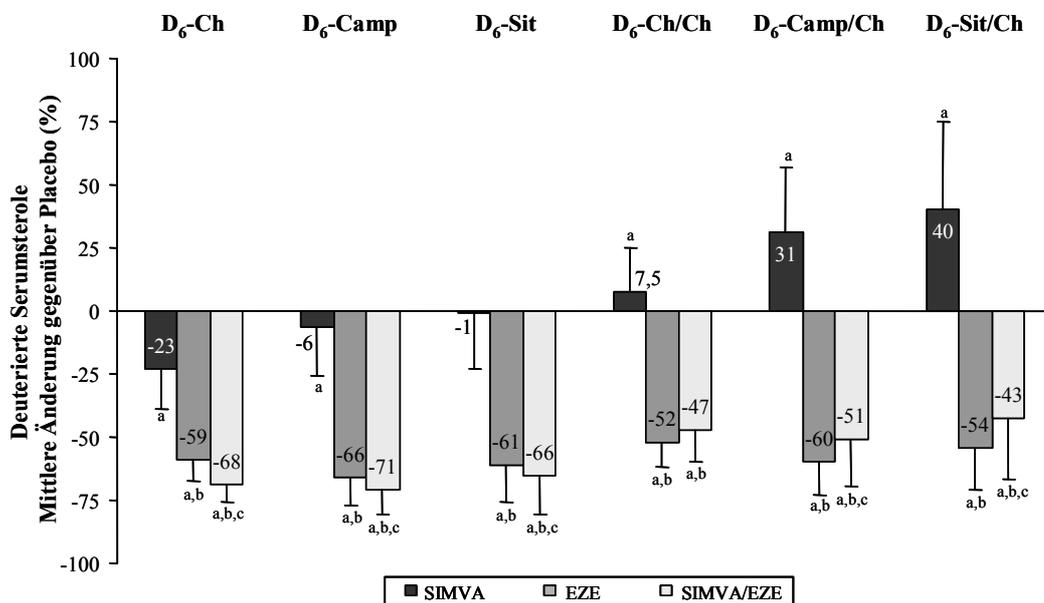


Abbildung 5.8 Mittlere prozentuale Änderung der Serumkonzentrationen von D₆-Cholesterol (D₆-Ch), D₆-Campesterol (D₆-Camp) und D₆-Sitosterol (D₆-Sit) (absolut und cholesterol-standardisiert) gegenüber Placebo bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie nach der Behandlung mit Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Säulen mit Fehlerbalken entsprechen MW ± SD. ^a signifikant verschieden von Placebo ($P < 0,05$); ^b signifikant verschieden von SIMVA ($P < 0,001$); ^c signifikant verschieden von EZE ($P < 0,05$).

Die folgenden Abbildungen (**Abbildung 5.9** und **Abbildung 5.10**) zeigen die individuellen absoluten Änderungen der Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole (absolut und cholesterol-standardisiert) in den Behandlungsphasen gegenüber Placebo. Unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib waren die Serumkonzentrationen von D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol bei jedem Studienteilnehmer erniedrigt gegenüber Placebo. Das Ausmaß der Änderung korrelierte dabei signifikant negativ mit der entsprechenden Serumkonzentration unter Placebo (Korrelationskoeffizient r zwischen $-0,918$ und $-0,964$ mit $P < 0,001$ für alle; **Abbildung 5.9**) Das heißt, je höher die Konzentrationen der deuterierten Sterole unter Placebo waren, desto größer waren die Beträge, um die sie unter Ezetimib sowie Simvastatin plus Ezetimib vermindert waren. Die gleichen Beobachtungen konnten auch für die cholesterol-standardisierten Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole gemacht werden (Korrelationskoeffizient r zwischen $-0,724$ und $-0,945$ mit $P < 0,001$ für alle; **Abbildung 5.10**).

Unter der Behandlung mit Simvastatin änderten sich die deuterierten Sterole im Serum der Studienteilnehmer individuell sehr unterschiedlich gegenüber Placebo. So wurde die D₆-Cholesterolkonzentration bei 28 der 33 Studienteilnehmer unter Simvastatin zwischen -3% und -40% vermindert gegenüber Placebo. Bei den übrigen 5 Studienteilnehmern wurde sie zwischen $+2\%$ und $+17\%$ erhöht. Die D₆-Campesterolkonzentration wurde unter Simvastatin bei 21 von 33 Studienteilnehmern zwischen -1% und -41% gegenüber Placebo erniedrigt; bei dem Rest erhöhte sie sich zwischen $+0,5\%$ und $+61\%$. Die D₆-Sitosterolkonzentration war in der Simvastatin-Phase bei 18 Studienteilnehmern vermindert (-1% bis -50%) gegenüber Placebo und damit bei nahezu der Hälfte erhöht ($+2\%$ bis $+17\%$). Zwischen den D₆-Sterolkonzentrationen unter Placebo und dem absoluten Ausmaß, um das sie unter Simvastatin verändert wurden, bestand auch eine negative Korrelation, diese war jedoch insbesondere bei den D₆-Phytosterolkonzentrationen deutlich schwächer als für die Änderungen unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib beobachtet (**Abbildung 5.9**).

Die cholesterol-standardisierten D₆-Sterolkonzentrationen waren bei der Mehrzahl der Studienteilnehmer unter Simvastatin höher als unter Placebo. Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Quotienten unter Placebo und deren absoluten Änderungen unter Simvastatin (**Abbildung 5.10**).

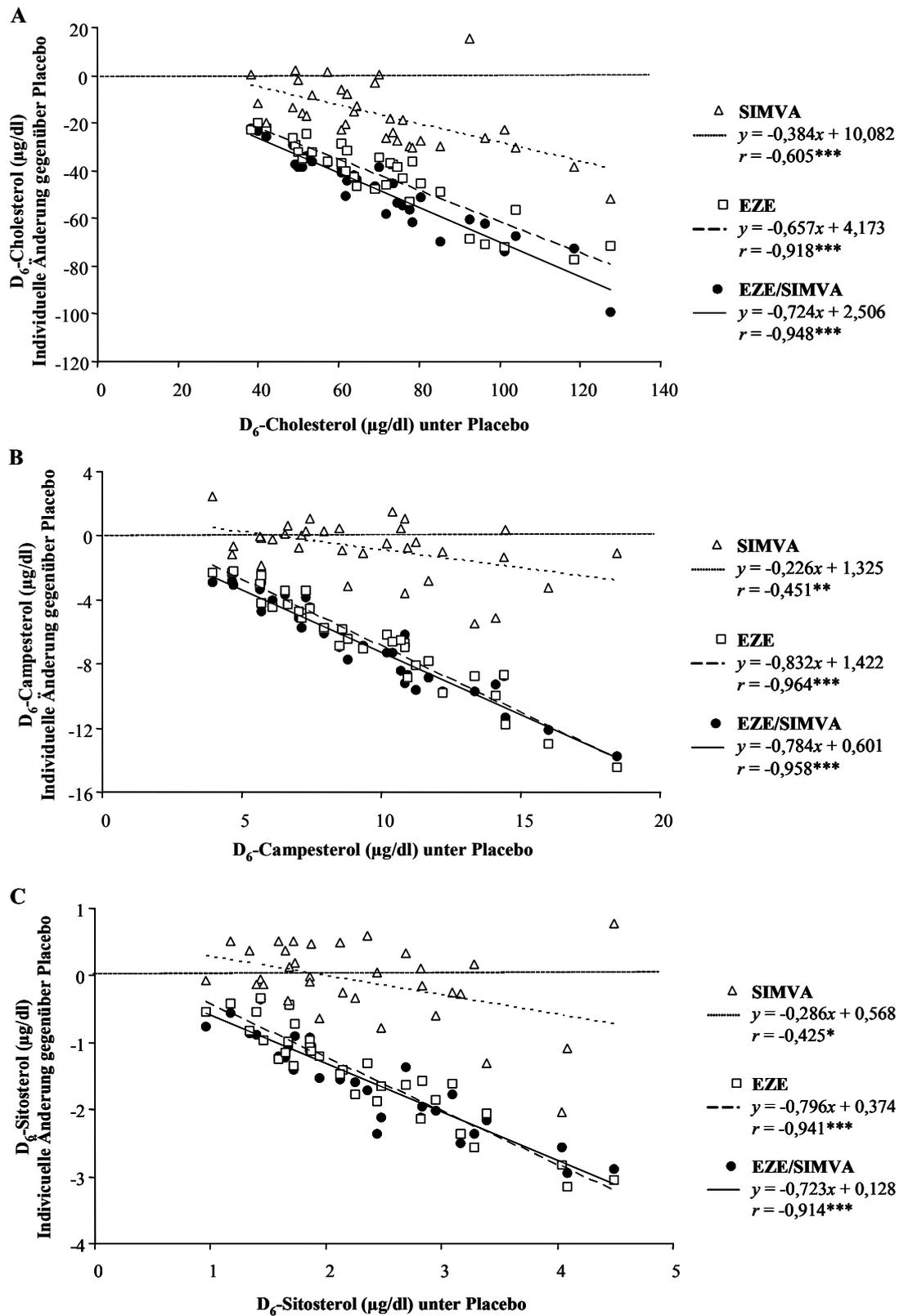


Abbildung 5.9 Individuelle Änderungen der Serumkonzentrationen für D_6 -Cholesteroll (A), D_6 -Campesteroll (B) und D_6 -Sitosteroll (C) gegenüber Placebo bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterollämie unter der Behandlung mit Simvastatin (Δ SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (\square EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (\bullet SIMVA/EZE; 20/10 mg/d) dargestellt in Abhängigkeit von den entsprechenden Konzentrationen unter Placebo. Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$).

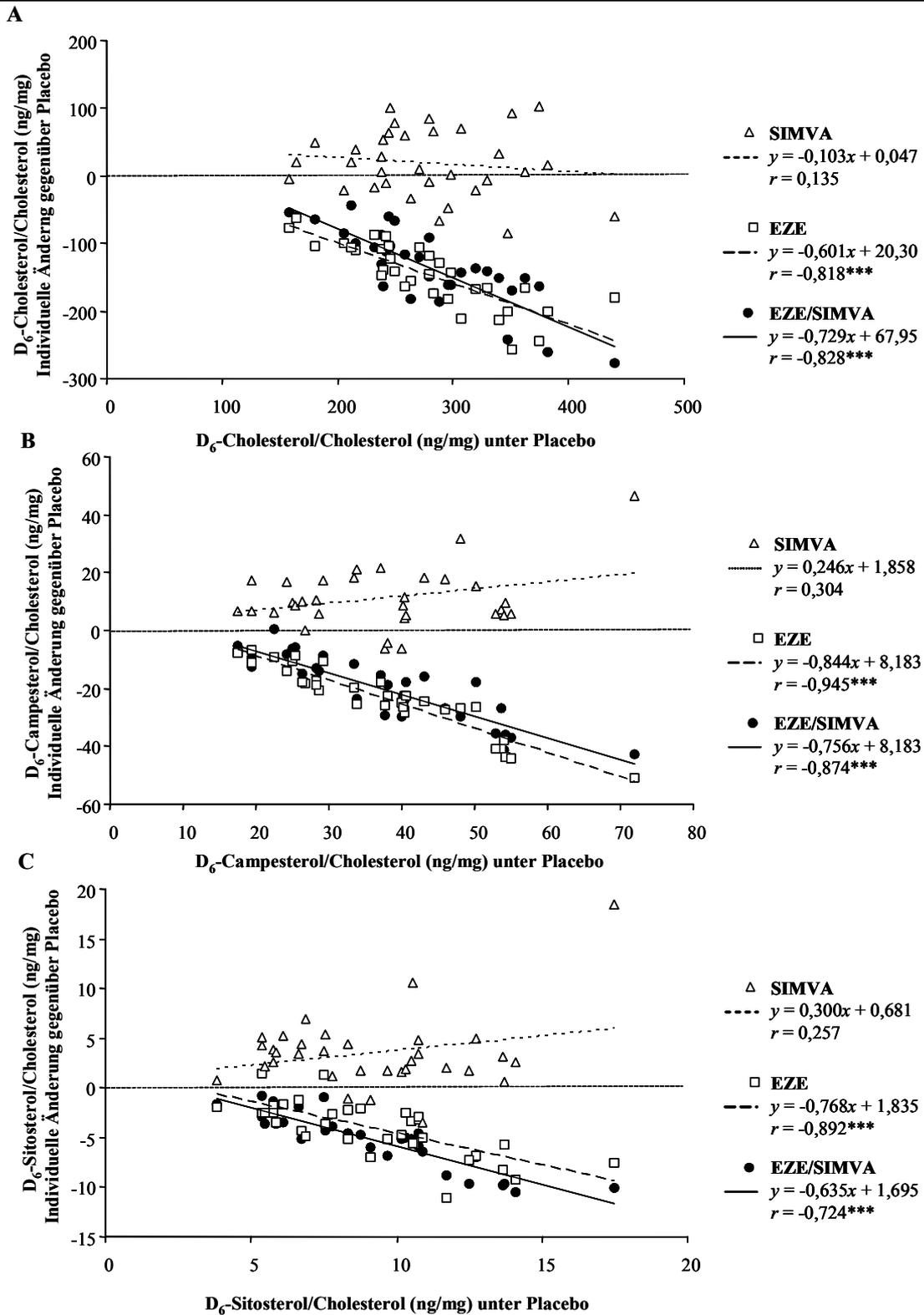


Abbildung 5.10 Individuelle Änderungen der Serumkonzentrationsquotienten D_6 -Cholesterol/Cholesterol (A), D_6 -Campesterol/Cholesterol (B) und D_6 -Sitosterol/Cholesterol (C) gegenüber Placebo bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Simvastatin (Δ SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (\square EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (\bullet SIMVA/EZE; 20/10 mg/d) dargestellt in Abhängigkeit von den entsprechenden Serumkonzentrationsquotienten unter Placebo. Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$).

5.2.3.3 Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole

Die Serumkonzentrationen der deuterierten Phytosterole D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol korrelierten in allen Medikationsphasen höchst signifikant miteinander ($P < 0,001$ und $n = 33$ für alle, Korrelationskoeffizienten siehe **Abbildung 5.11 A**). Dieses galt auch für die Serumkonzentrationen von D₆-Campesterol und D₆-Cholesterol; die Korrelation unter Placebo und Simvastatin war jedoch nicht ganz so stark wie zwischen den beiden deuterierten Phytosterolen (**Abbildung 5.11 B**). Der Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen für D₆-Cholesterol und D₆-Sitosterol war in allen vier Behandlungsphasen vergleichsweise am schwächsten (Placebo: $r = 0,763$; Simvastatin: $r = 0,637$; Ezetimib: $r = 0,438$; Simvastatin plus Ezetimib: $r = 0,675$ mit $P < 0,001$ und $n = 33$ für alle außer Ezetimib mit $P = 0,011$; Daten nicht graphisch dargestellt).

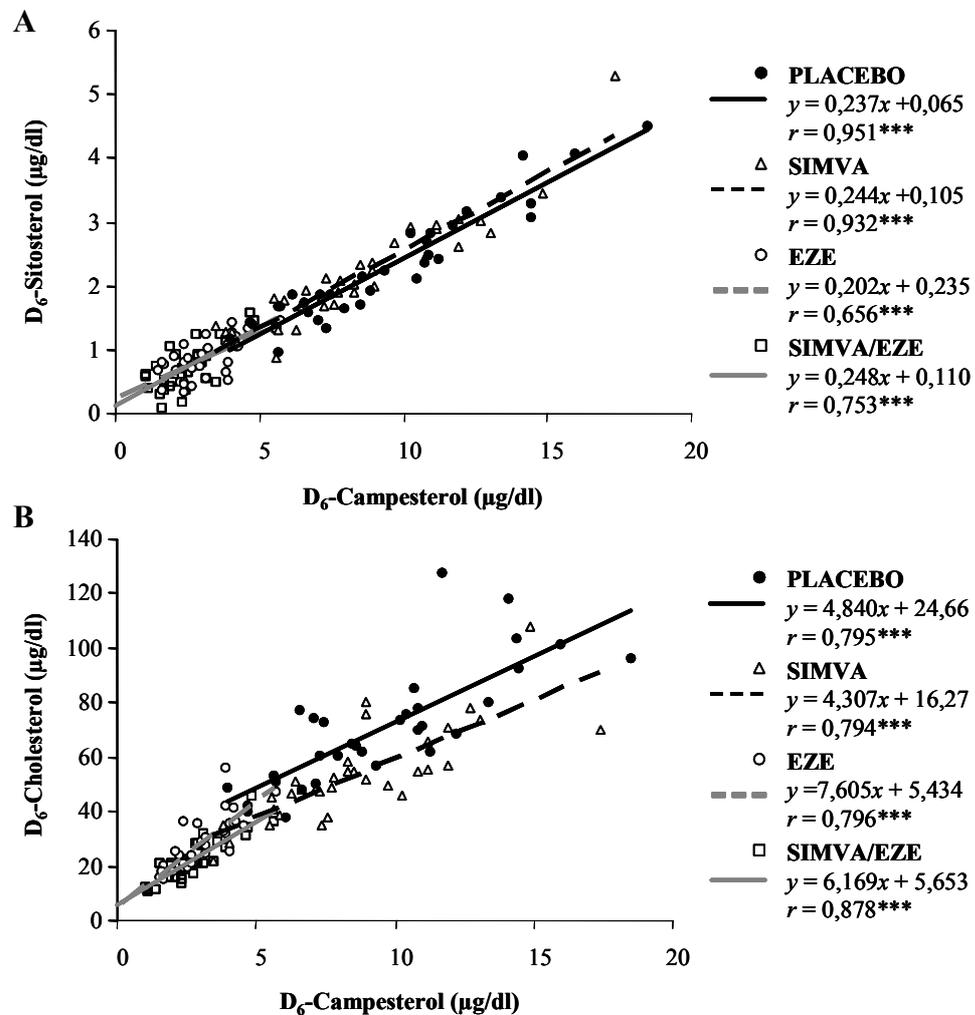


Abbildung 5.11 Korrelationen zwischen den Serumkonzentrationen von oral verabreichtem D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol (A) sowie D₆-Campesterol und D₆-Cholesterol (B) bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolemie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d).

5.2.3.4 Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten und natürlichen Sterole

Die Konzentrationen der deuterierten Sterole korrelierten in allen Medikationsphasen signifikant mit den Konzentrationen ihres entsprechenden natürlichen Sterols ($P < 0,001$ für alle). Insgesamt war die Korrelation zwischen den deuterierten und natürlichen pflanzlichen Sterolen stärker als zwischen D₆-Cholesterol und Cholesterol (**Tabelle 5.7**).

Tabelle 5.7 Korrelationen zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten D₆-Sterole und ihren entsprechenden natürlichen Sterolen bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (20 mg/d), Ezetimib (10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (20/10 mg/d).

Variablenpaar	Placebo	Simvastatin	Ezetimib	Simvastatin plus Ezetimib	Gesamt (n=132)
D ₆ -Cholesterol und Cholesterol	0,638	0,624	0,543	0,736	0,658
D ₆ -Campesterol und Campesterol	0,759	0,763	0,696	0,748	0,886 ^{a)}
D ₆ -Sitosterol und Sitosterol	0,744	0,631	0,603	0,597	0,853

Die Korrelation war in allen Fällen signifikant mit $P \leq 0,001$

^{a)} Korrelationskoeffizient mit eingeschränkter Gültigkeit, da beide Variablen nur annähernd normalverteilt waren

In **Abbildung 5.12** sind die durchschnittlichen Quotienten der deuterierten Sterole zu ihren entsprechenden natürlichen Sterolen (das heißt D₆-Cholesterol/Cholesterol, D₆-Campesterol/Campesterol, D₆-Sitosterol/Sitosterol) für die 33 Studienteilnehmer unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib dargestellt. Die Quotienten D₆-Campesterol/Campesterol und D₆-Sitosterol/Sitosterol lagen unter Placebo bei $19,0 \pm 6,5$ ng/mg bzw. $7,51 \pm 2,02$ ng/mg. Sie änderten sich im Gegensatz zu D₆-Cholesterol/Cholesterol (vergleiche **Abbildung 5.8**) unter den drei weiteren Studienmedikationen Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib im Mittel nicht signifikant (Varianzanalysen für beide Quotienten mit dem Faktor *Studienmedikation* ergaben einen P -Wert $> 0,05$).

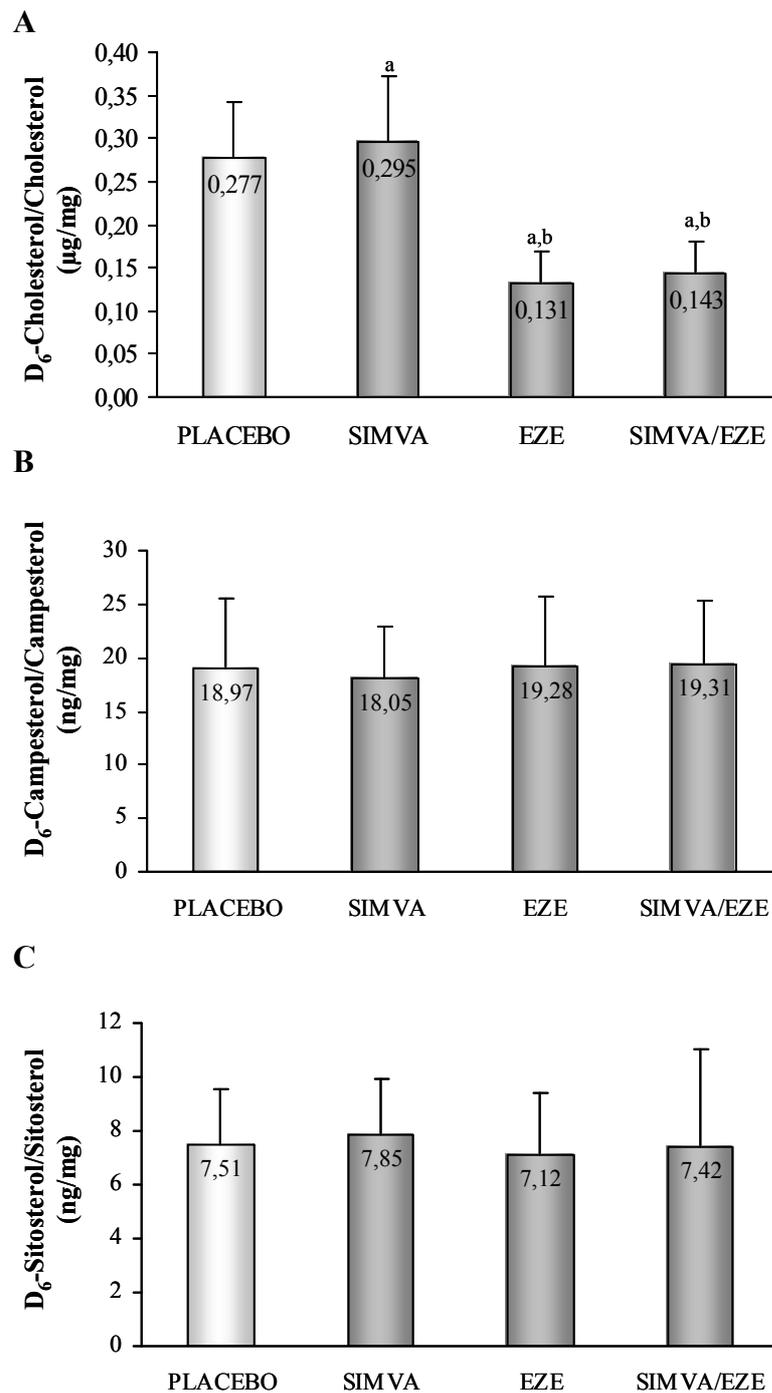
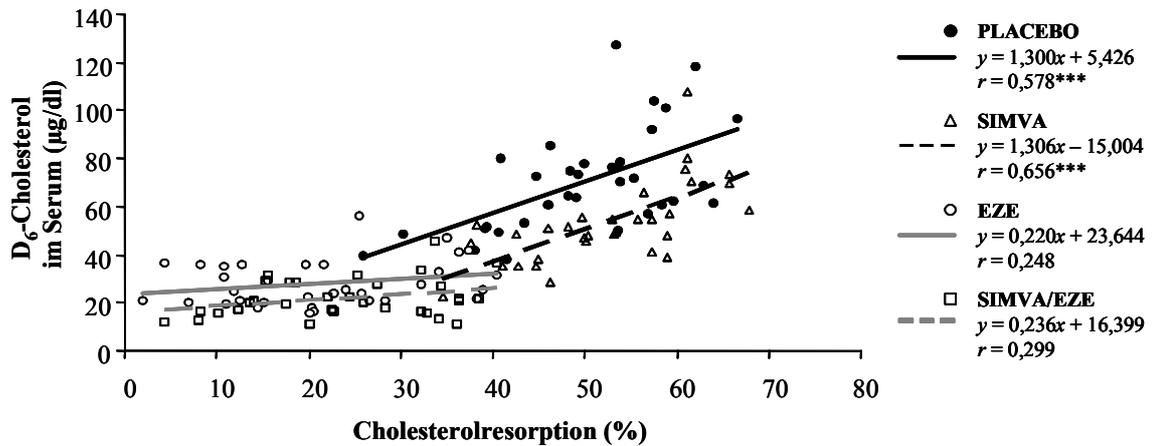


Abbildung 5.12 Serumkonzentrationsquotienten D₆-Cholesterol/Cholesterol (A), D₆-Campesterol/Campesterol (B) und D₆-Sitosterol/Sitosterol (C) bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Säulen mit Fehlerbalken entsprechen MW + SD. ^asignifikant verschieden von Placebo ($P < 0,05$); ^bsignifikant verschieden von SIMVA ($P < 0,001$).

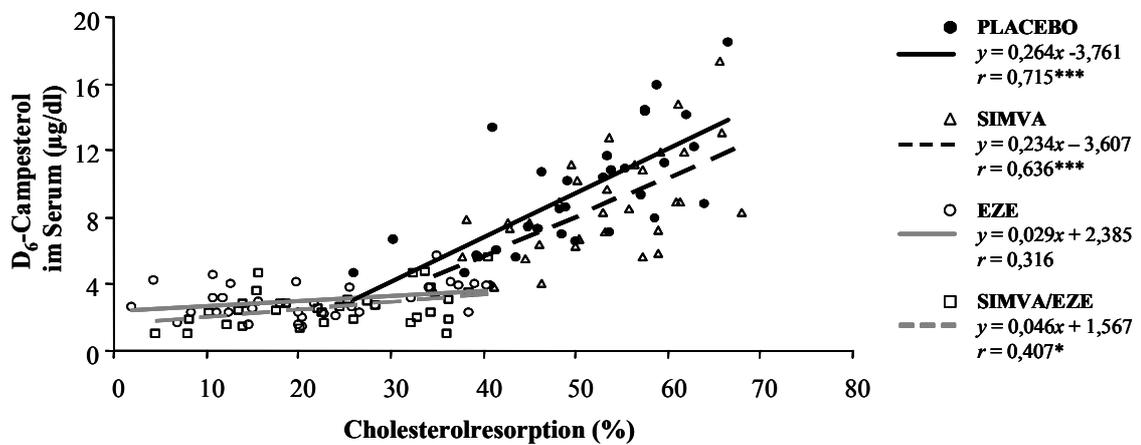
5.2.4 Zusammenhang zwischen der Cholesterolresorption und den Serumsterolen

In den folgenden Abbildungen sind die absoluten (**Abbildung 5.13**) und cholesterolstandardisierten (**Abbildung 5.14**) Serumkonzentrationen von D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol in Abhängigkeit von der nach Lütjohann *et al.* (39) bestimmten Cholesterolresorptionsrate der Studienteilnehmer dargestellt. Es wird deutlich, dass unter der Behandlung mit Placebo die Serumkonzentrationen der deuterierten Serumsterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol und deren Quotienten zu Cholesterol jeweils höchst signifikant mit der Cholesterolresorption korrelierten. Die Korrelation war am stärksten für den D₆-Campesterol/Cholesterol-Quotienten ($r = 0,731$; **Abbildung 5.14 B**), gefolgt von der absoluten D₆-Campesterolkonzentration ($r = 0,715$; **Abbildung 5.13 B**) und der cholesterolstandardisierten D₆-Cholesterolkonzentration ($r = 0,640$; **Abbildung 5.14 A**; $P < 0,001$ und $n = 33$ für alle). Auch unter der Behandlung mit Simvastatin korrelierten die deuterierten Sterole im Serum der Studienteilnehmer signifikant mit der Cholesterolresorptionsrate. Am stärksten war die Korrelation mit der Cholesterolresorption für die absolute D₆-Cholesterolkonzentration ($r = 0,656$; **Abbildung 5.13 A**), gefolgt von der absoluten D₆-Campesterolkonzentration ($r = 0,636$; **Abbildung 5.13 B**) und der cholesterolstandardisierten D₆-Cholesterolkonzentration ($r = 0,574$; **Abbildung 5.14 A**; $P < 0,001$ und $n = 33$ für alle). Die Regressionsgeraden, die den Zusammenhang zwischen Cholesterolresorption (x-Achse) und jeweiligem Serumsterol (y-Achse) unter der Behandlung mit Simvastatin beschrieben, waren nicht signifikant verschieden von den jeweiligen Regressionsgeraden unter Placebo (das heißt die Parameter Steigung und y-Achsenabschnitt der linearen Geradengleichung unter Simvastatin lagen im 95%-Konfidenzintervall der Parameter der linearen Geradengleichung unter Placebo). Unter der Behandlung mit Ezetimib bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole (absolut und cholesterolstandardisiert) und der Cholesterolresorption. In der Simvastatin-plus-Ezetimib-Phase korrelierten von den deuterierten Serumsterolen nur die D₆-Campesterolkonzentrationen (absolut und cholesterolstandardisiert) signifikant, aber recht schwach mit der Cholesterolresorptionsrate (D₆-Campesterol: $r = 0,407$ und $P = 0,019$, **Abbildung 5.13 B**; D₆-Campesterol/Cholesterol: $r = 0,354$ und $P = 0,043$, **Abbildung 5.14 B**). Die Regressionsgeraden, die den Zusammenhang zwischen der Serumsterolkonzentration und der Cholesterolresorption unter der Behandlung mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib widerspiegelten, waren bei keinem Serumsterol signifikant verschieden voneinander; im Vergleich zur jeweiligen Regressionsgerade unter Placebo wiesen sie jedoch signifikant niedrigere Steigungen auf.

A



B



C

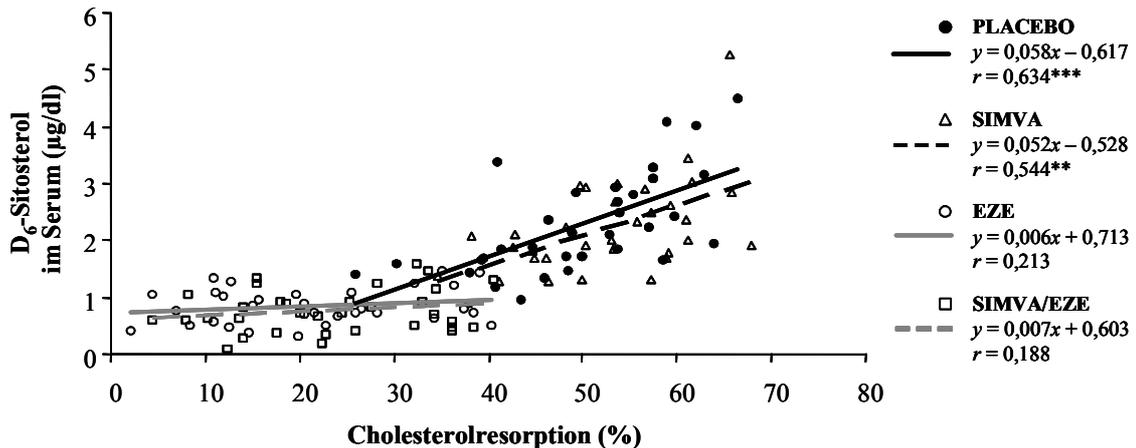


Abbildung 5.13 Zusammenhang zwischen der Cholesteroleresorptionsrate (%) und der Serumkonzentration von D₆-Cholesterol (A), D₆-Campesterol (B) und D₆-Sitosterol (C) bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$).

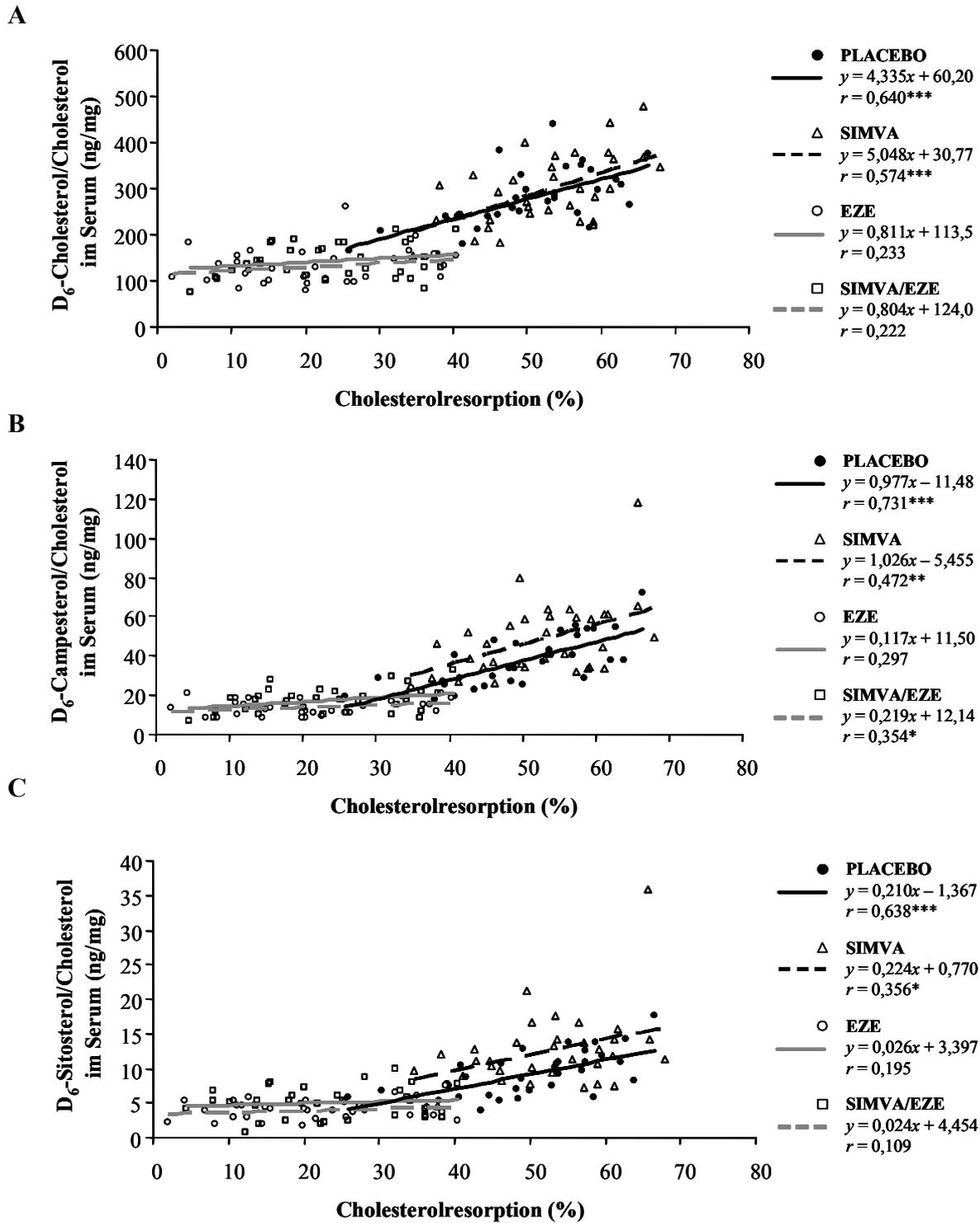


Abbildung 5.14: Zusammenhang zwischen der Cholesterolresorptionsrate (%) und dem Serumquotienten D₆-Cholesterol/Cholesterol (A), D₆-Campesterol/Cholesterol (B) und D₆-Sitosterol/Cholesterol (C) bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch $^*(P < 0,05)$, $^{**}(P < 0,01)$ und $^{***}(P < 0,001)$.

Im Gegensatz zu den deuterierten Sterolen korrelierten die natürlichen Phytosterole Campesterol und Sitosterol in allen Behandlungsphasen (mit Ausnahme des Sitosterol/Cholesterol-Quotienten unter Simvastatin) signifikant mit der Cholesterolresorption (**Tabelle 5.8**). Von den natürlichen Sterolen korrelierte die Serumkonzentration von Campesterol am stärksten mit der Cholesterolresorption (**Abbildung 5.15**). Im Vergleich zu den deuterierten Sterolen war der Zusammenhang für die natürlichen Phytosterole unter Placebo und Simvastatin schwächer und unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib stärker.

Die Serumcholesterolkonzentration war unter der Behandlung mit Simvastatin signifikant mit der Cholesterolresorption assoziiert ($r = 0,425$; $P = 0,014$; **Tabelle 5.8**).

Tabelle 5.8 Korrelation zwischen der Cholesterolresorptionsrate (%) und den Serumsterolen bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Ezetimib (10 mg/d), Simvastatin (20 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (20/10 mg/d).

Serumsterol	Cholesterolresorptionsrate (%)			
	Placebo	Simvastatin	Ezetimib	Simvastatin plus Ezetimib
Deutierte Sterole				
<i>Serumkonzentrationen (µg/dl)</i>				
D ₆ -Cholesterol	0,578***	0,656***	0,248	0,299
D ₆ -Campesterol	0,715***	0,636***	0,316	0,407*
D ₆ -Sitosterol	0,634***	0,544**	0,213	0,188
<i>Konzentrationsquotienten (ng/mg)</i>				
D ₆ -Cholesterol/Cholesterol	0,640***	0,574***	0,233	0,222
D ₆ -Campesterol/Cholesterol	0,731***	0,472**	0,297	0,354*
D ₆ -Sitosterol/Cholesterol	0,638***	0,356*	0,196	0,109
Natürliche Sterole				
<i>Serumkonzentrationen (mg/dl)</i>				
Cholesterol	0,171	0,425*	0,094	0,255
Campesterol	0,547***	0,453**	0,504**	0,483**
Sitosterol	0,551***	0,395*	0,418*	0,422*
<i>Konzentrationsquotienten (µg/mg)</i>				
Campesterol/Cholesterol	0,541**	0,356*	0,463**	0,439*
Sitosterol/Cholesterol	0,513**	0,271	0,355*	0,353*

Signifikante Pearsonsche Korrelationskoeffizienten mit * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$)

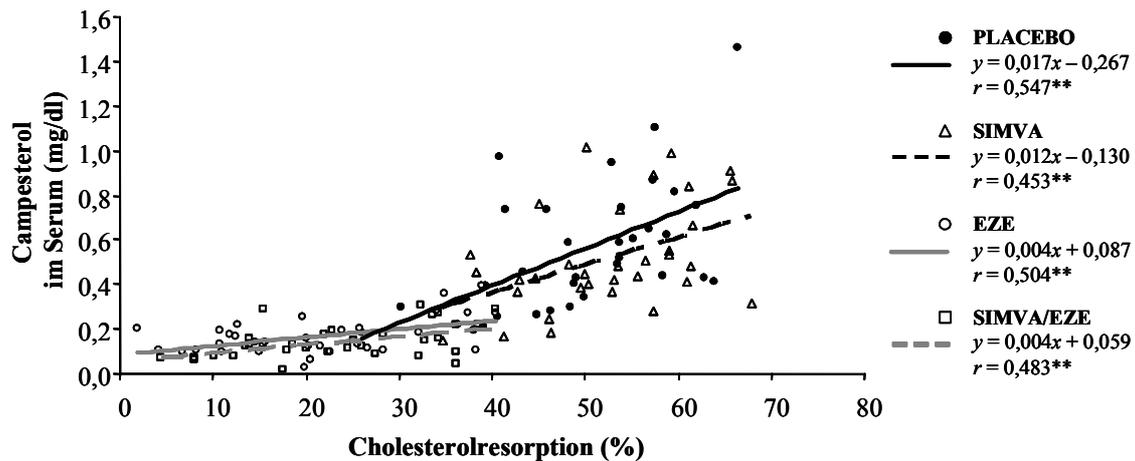


Abbildung 5.15 Zusammenhang zwischen der Cholesterolesorptionsrate (%) und der Campesterolkonzentration im Serum von 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch $^*(P < 0,05)$, $^{**}(P < 0,01)$ und $^{***}(P < 0,001)$.

5.2.5 Zusammenhang zwischen der Cholesterolsynthese und den Serumsterolen

In der vorliegenden Studie waren bei den Studienteilnehmern vor allem unter der Gabe von Placebo und Simvastatin signifikante Korrelationen zwischen der Cholesterolsynthese und den (absoluten und cholesterol-standardisierten) Serumkonzentrationen der drei deuterierten Sterolen zu beobachten (**Tabelle 5.9**). Die absoluten und cholesterol-standardisierten D₆-Campesterolkonzentrationen im Serum korrelierten sogar unter allen vier Behandlungen signifikant negativ mit der Cholesterolsyntheserate (**Abbildung 5.16 A und B**). Auch für die cholesterol-standardisierten D₆-Cholesterolkonzentrationen zeigte sich in allen Behandlungsphasen (außer unter Simvastatin plus Ezetimib) ein signifikant negativer Zusammenhang mit der Cholesterolsynthese (**Abbildung 5.16 C**). Die Steigungen der Regressionsgeraden unterschieden sich unter der Behandlung mit Placebo und Simvastatin in den einzelnen Graphen der **Abbildung 5.16** nicht signifikant voneinander. Gleiches galt für die Steigungen der Regressionsgeraden unter der Behandlung mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib, die im Vergleich zu Placebo jedoch signifikant niedriger waren (das heißt nicht im 95 %-Konfidenzintervall des jeweiligen Steigungsparameters unter Placebo).

Bei den natürlichen Sterolen waren zwischen der Cholesterolsynthese und den Serumkonzentrationen der Phytosterole unter der Behandlung mit Placebo und Simvastatin signifikant negative Korrelationen zu beobachten. Insgesamt war der Zusammenhang der Cholesterolsynthese mit den natürlichen Serumsterolen jedoch schwächer als für die deuterierten Sterole im Serum.

Tabelle 5.9 Korrelation zwischen der Cholesterolsyntheserate (mg/d) und den Serumsterolen bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Ezetimib (10 mg/d), Simvastatin (20 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (20/10 mg/d).

Serumsterol	Cholesterolsynthese (mg/d)			
	Placebo n = 33	Simvastatin n = 33	Ezetimib n = 33	Simvastatin plus Ezetimib n = 33
Deuterierte Sterole				
<i>Serumkonzentrationen (µg/dl)</i>				
D ₆ -Cholesterol	-0,375*	-0,530**	-0,405*	-0,251
D ₆ -Campesterol	-0,453**	-0,622***	-0,404*	-0,354*
D ₆ -Sitosterol	-0,391*	-0,579***	-0,133	-0,200
<i>Konzentrationsquotienten (ng/mg)</i>				
D ₆ -Cholesterol/Cholesterol	-0,561***	-0,619***	-0,475**	-0,310
D ₆ -Campesterol/Cholesterol	-0,567***	-0,594***	-0,449**	-0,399*
D ₆ -Sitosterol/Cholesterol	-0,506**	-0,495**	-0,154	-0,213
Natürliche Sterole				
<i>Serumkonzentrationen (mg/dl)</i>				
Cholesterol	0,136	-0,168	0,002	-0,034
Campesterol	-0,437*	-0,430*	-0,308	-0,286
Sitosterol	-0,406*	-0,336	-0,251	-0,035
<i>Konzentrationsquotienten (µg/mg)</i>				
Campesterol/Cholesterol	-0,534**	-0,438*	-0,297	-0,305
Sitosterol/Cholesterol	-0,497**	-0,322	-0,243	-0,042

Signifikante Pearsonsche Korrelationskoeffizienten mit * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$)

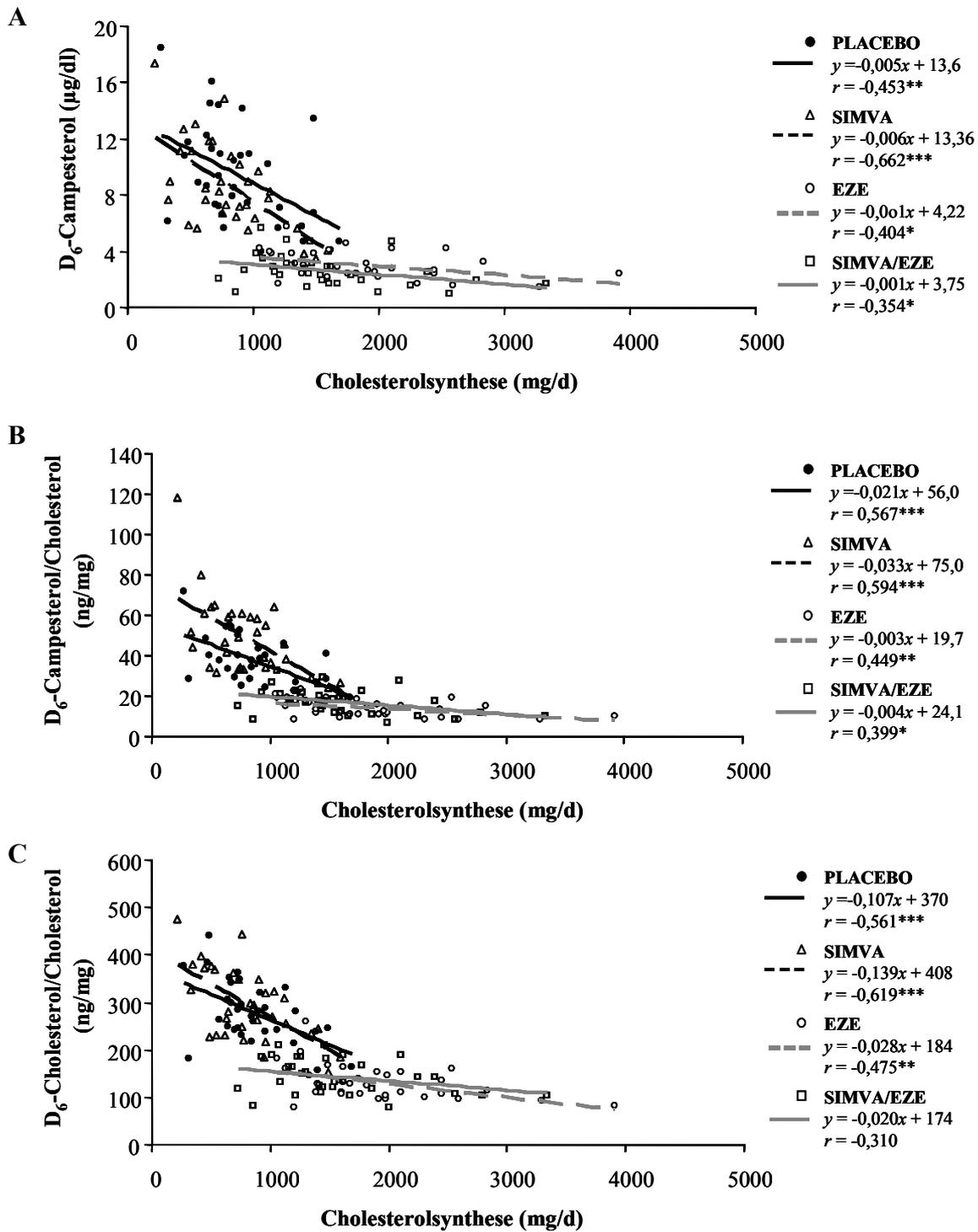


Abbildung 5.16 Beziehung zwischen der Cholesterolsynthese (mg/d) und der Serumkonzentration von D₆-Campesterol (A), D₆-Campesterol/Cholesterol (B) und D₆-Cholesterol/Cholesterol (C) bei 33 Männern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, Simvastatin (SIMVA; 20 mg/d), Ezetimib (EZE; 10 mg/d) und Simvastatin plus Ezetimib (SIMVA/EZE; 20/10 mg/d). Parameter a und b der linearen Regressionsgeraden ($y = ax + b$) sind der Grafik zu entnehmen. Signifikante Korrelationskoeffizienten (r) sind gekennzeichnet durch * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) und *** ($P < 0,001$).

6 DISKUSSION

Die intestinale Cholesterolresorption leistet einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der Cholesterolhomöostase im Körper. Die Untersuchung der Cholesterolresorption kann daher wichtige Informationen über die Regulation der Cholesterolhomöostase unter physiologischen Bedingungen, aber auch während einer Krankheit oder einer medikamentösen Behandlung liefern. Zur Bestimmung der Cholesterolresorption wurde in den letzten Jahren die *continuous feeding dual stable isotope method* nach Lütjohann *et al.* (39) in mehreren klinischen Studien erfolgreich eingesetzt (12, 52, 120, 142). Sie ist jedoch arbeitsintensiv und erfordert von den Studienteilnehmern ein umständliches Sammeln von Faecesproben. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol, die zur Sterolresorptionsbestimmung nach Lütjohann *et al.* (39) Studienteilnehmern einer klinischen Studie oral verabreicht wurden, im Serum der Studienteilnehmer quantifiziert. Ziel war es zu untersuchen, ob zwischen der Cholesterolresorption (bestimmt nach der Methode von Lütjohann *et al.* (39) über Faecesproben) und den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole ein Zusammenhang besteht.

Die Quantifizierung der deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol erfolgte gemeinsam mit den entsprechenden natürlich vorkommenden Sterolen im Serum mittels gaschromatographisch/massenspektrometrischer Methoden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert wurden. Im folgenden ersten Teil der Diskussion werden die Analysemethoden insbesondere unter Betrachtung der Validierungsergebnisse diskutiert. Der zweite Teil der Diskussion bezieht sich auf die Ergebnisse der klinischen Studie, in der die entwickelten Analysemethoden zur Anwendung kamen.

6.1 Methoden zur Bestimmung der deuterierten und natürlichen Serumsterole

Die *continuous feeding dual stable isotope method* nach Lütjohann *et al.* (39) zur Bestimmung der Sterolresorption über Faecesproben wurde bereits in mehreren klinischen Studien angewendet und den Studienteilnehmern dazu deuterierte Sterole oral verabreicht. Eine Quantifizierung der resorbierten deuterierten Sterole im Serum wurde jedoch nie durchgeführt. Grund hierfür war der große Konzentrationsunterschied zwischen natürlichem Cholesterol und den Spuren der deuterierten Sterole im Serum. Das Nachweisvermögen der in der Abtei-

lung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn etablierten GC/MS-Methode zur Bestimmung von Serumsterolen war in diesem Zusammenhang nicht ausreichend.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, basierend auf einem bestehenden Analyseverfahren (144), GC/MS-Methoden aufzubauen, mit denen Spuren der deuterierten Sterole D₆-Sitosterol, D₆-Campesterol und D₆-Cholesterol im Serum von Studienteilnehmern nach oraler Gabe der Substanzen simultan mit dem jeweils entsprechend natürlich vorkommenden Sterol (Cholesterol, Campesterol und Sitosterol) quantifiziert werden konnten. Dies geschah für die Analyse der Phytosterole im Wesentlichen durch eine Abtrennung der Phytosterole vom Cholesterol mittels HPLC und einer nachfolgenden Anreicherung der Phytosterole vor der gaschromatographischen Trennung. Für die Cholesterolanalyse wurden die extrahierten Sterole verdünnt, um anschließend gaschromatographisch getrennt zu werden. Durch die Wahl geeigneter Fragmentationen für die Detektion im SIM-Modus des MS wurde das Nachweisvermögen der Analyseverfahren für die deuterierten Sterole deutlich gesteigert.

Die Analyse von Gesamtcholesterol im Serum wird in der Routine normalerweise mit enzymatischen/kolorimetrischen Methoden durchgeführt (155). Mit diesen Routinemethoden ist jedoch eine Unterscheidung zwischen Cholesterol und Phytosterolen nicht möglich. Die gleichzeitige Analyse mehrerer strukturell ähnlicher Sterole in biologischen Materialien setzt daher ein leistungsfähigeres analytisches Verfahren voraus, mit dem die Sterole zuverlässig und reproduzierbar voneinander getrennt und einzeln quantifiziert werden können. In den letzten Jahrzehnten haben sich dafür vor allem gaschromatographische Verfahren etabliert (156). Als Detektoren werden hauptsächlich der Flammenionisationsdetektor (FID) und das Massenspektrometer (MS) eingesetzt. Nur das MS erlaubt eine Unterscheidung zwischen einem mit stabilen Isotopen markiertem Sterol und dem entsprechenden nicht-markiertem Sterol. Die Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC/MS) hat den Vorteil, dass sie die gute Trennfähigkeit durch das gaschromatographische Verfahren mit der hohen Nachweisempfindlichkeit durch den massenspektrometrischen Detektor kombiniert. Auch die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/MS) hat sich in den letzten Jahren aufgrund hoher Sensitivität, Selektivität und Einsatzflexibilität zu einer viel versprechenden analytischen Methode für Steroide entwickelt. Die Anschaffungskosten sind jedoch sehr hoch und LC/MS-Geräte daher häufig nicht verfügbar (157). Zur Erfassung der Isotopenanreicherung in biologischen Materialien ist die GC/MS immer noch die bisher am häufigsten verwendete Methode (14, 39, 158, 159).

6.1.1 Serumaufarbeitung

Die Aufbereitung der Serumproben für die GC/MS-Analyse von D₆-Cholesterol und nicht-markiertem Cholesterol begann mit der Spaltung der Esterbindungen zwischen Sterolen und Fettsäuren (Verseifung) durch die Zugabe von ethanolischer Natriumhydroxidlösung (alkalische Hydrolyse). Es folgte die Extraktion der Sterole aus dem Probengemisch mittels Cyclohexan und die Derivatisierung der Sterole zu Trimethylsilyletherverbindungen, die eine bessere Verdampfbarkeit aufweisen (145). Die extrahierten Sterole mussten aufgrund des hohen Anteils an natürlichem Cholesterol für die GC/MS-Analysen verdünnt werden, um die Säule nicht mit Cholesterol zu überladen. Der kritische Punkt dabei war, dass die niedrigen D₆-Cholesterolkonzentrationen durch die Verdünnung nicht unter die Bestimmungsgrenze fallen durften. Mit einem Einsatz von 20 µl Serum und Aufnahme der Sterole in einem Lösungsmittelvolumen von 1 ml lagen die D₆-Cholesterolkonzentrationen in allen Serumproben der klinischen Studie über der Bestimmungsgrenze von 21 µg/dl. Gleichzeitig wies die Peakform für natürliches Cholesterol in den Chromatogrammen auf keine starke Überladung hin (**Abbildung 5.1**). Mit der aufgebauten GC/MS-Methode war demnach trotz des großen Konzentrationsunterschiedes zwischen D₆-Cholesterol und nicht-markiertem Cholesterol in den Serumproben (bis zu einem Faktor 4000) eine simultane Analyse beider Substanzen möglich.

Die deuterierten Phytosterole, die in den Serumproben in sehr niedrigen Konzentrationen vorlagen, konnten nur in angereicherter Form mittels GC/MS analysiert werden. Auch hier erfolgte zunächst eine alkalische Hydrolyse und Extraktion der Sterole aus einem großen Serumaliquot von 750 µl. Die Phytosterole wurden anschließend vom Cholesterol und anderen Serumbestandteilen mittels HPLC und einem Fraktionssammler isoliert, angereichert und derivatisiert. Bei einer Anreicherung aller extrahierten Sterole hätte der vergleichsweise hohe Anteil an natürlichem Cholesterol zu einer Überladung der Kapillarsäule geführt und die gesamte chromatographische Trennung gestört bzw. unmöglich gemacht. Darüber hinaus führen große Cholesterolmengen im MS zu einer schnellen Verschmutzung der Ionenquelle. Eine Messung mehrerer Serumproben unter gleichen Bedingungen wäre damit nicht mehr möglich gewesen. Die Sterole aus 750 µl Serum wurden vor der GC/MS-Analyse um den Faktor 7,5 aufkonzentriert. Auch die niedrigsten Phytosterolkonzentrationen in den Serumproben der Studienteilnehmer konnten auf diese Weise oberhalb der jeweiligen Bestimmungsgrenze (**Tabelle 5.1**) ermittelt werden.

6.1.2 Selektivität

Die Selektivität einer Methode bezieht sich auf ihre Fähigkeit, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen (152). Durch die Kopplung von Gaschromatographie mit einem massenspektrometrischen Detektor waren die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden sehr selektiv. So wurden die Sterolderivate durch die Gaschromatographie voneinander getrennt und über die Retentionszeiten konnte eine erste Identifizierung erfolgen. Die Verwendung des Massenspektrometers im Scan-Modus erlaubte eine eindeutige Identifizierung der getrennten Sterolderivate über deren Massenspektren. Bei der eigentlichen Quantifizierung der Sterole im SIM-Modus des MS wurden für jedes Sterol neben dem Quantifier-Ion zwei weitere charakteristische Ionen als Qualifier-Ionen erfasst, die die Identität des Sterolpeaks absicherten. Dies hatte den Vorteil, dass auch im SIM-Modus eine Überlagerung der Signale durch Fremdstoffen schnell erkannt werden konnte und die Selektivität der Methode verbessert wurde. Da die Peakflächenverhältnisse für die drei jeweils sterolspezifischen Ionen über alle Serumanalysen hinweg konstant blieben, war eine Überlagerung durch Fremdstoffen auszuschließen. Durch die zusätzliche Erfassung der Quantifier-Ionen konnten die deuterierten und ihre jeweils entsprechenden nicht-deuterierten Sterole, die kurz hintereinander von der Säule eluierten, mit den etablierten Methoden in der SIM-Analyse eindeutig identifiziert werden. Die leicht verkürzten Retentionszeiten der deuterierten Sterole gegenüber den nicht-deuterierten Sterolen sind auf Dampfdruckisotopeneffekte zurückzuführen (145). Nicht jeder Peak, der ausgewertet wurde, war vollständig aufgelöst ($R > 1,5$) (**Abbildung 5.1** und **Abbildung 5.2**). Die Peaks ließen sich jedoch so integrieren, dass die Anforderungen an die Richtigkeit der Methode erfüllt waren (Kapitel 5.1.4). Für eine Optimierung der Methoden hinsichtlich einer noch höheren Auflösung bestand daher kein Anlass.

6.1.3 Nachweisvermögen

Aufgrund ethischer, physiologischer und wirtschaftlicher Aspekte wird die Menge an oral verabreichten deuterierten Sterolen in klinischen Studien zur Untersuchung der Sterolresorption möglichst gering gehalten. Durch die begrenzte Resorption und den Einfluss des Sterolresorptionshemmers Ezetimib waren die Konzentrationen der deuterierten Sterole in einem Teil der Serumproben der Studienteilnehmer sehr niedrig. Die Bestimmung der niedrigen Konzentrationen der deuterierten Sterole im Serum erforderte daher Analysemethoden mit

hohem Nachweisvermögen. Die Quantifizierung der Sterole wurde im SIM-Modus des MS durchgeführt, wodurch sich die Empfindlichkeit des MS generell um etwa zwei bis drei Zehnerpotenzen erhöht. Um das Nachweisvermögen noch weiter zu erhöhen, wurden die deuterierten Sterole auf den Massen der Fragment-Ionen mit der höchsten Intensität quantifiziert. Außerdem wurde von einer Erhöhung des Injektionsvolumens von 2 μl auf 3 μl am Gaschromatographen abgesehen, da dies mit einer Verringerung des Signal/Rauschverhältnis einhergegangen wäre. Insgesamt wurden auf diese Weise für die deuterierten Sterole D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol und D₆-Campesterol absolute Nachweisgrenzen zwischen 3 und 6 pg auf der Säule erreicht (**Tabelle 5.1**). Die absoluten Nachweisgrenzen für die natürlichen Sterole Campesterol, Sitosterol lagen rund einen Faktor 1,5 bis 2 höher. Der Grund dafür ist, dass für die Quantifizierung der natürlichen Sterole die weniger häufigen Molekülonen herangezogen wurden. Da Campesterol und Sitosterol in sehr viel höheren Konzentrationen als D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol in den Serumproben vorlagen, musste die Empfindlichkeit der Analyse bezüglich dieser Analyten nicht zusätzlich gesteigert werden.

Durch die Anreicherung der Phytosterole während der Aufarbeitung der Serumproben waren mit der HPLC-GC/MS-Methode deuterierte und natürliche Phytosterole bis zu einer Serumkonzentration von 31 ng/dl (D₆-Campesterol), 37 ng/dl (D₆-Sitosterol), 54 ng/dl (Campesterol) und 57 ng/dl (Sitosterol) nachweisbar (**Tabelle 5.1**). Im Vergleich können mit der GC/MS-Methode nach Prange, die als Ausgangsbasis für den Aufbau der Methode diente, Sitosterolkonzentrationen bis 440 ng/dl und Campesterolkonzentrationen bis 1190 ng/dl im Serum nachgewiesen werden (144). Das Nachweisvermögen der neu etablierten HPLC-GC/MS-Methode liegt damit gegenüber der Ausgangsmethode um mindestens einen Faktor 8 höher. Sie ist damit in besonderem Maße für die Analyse von Phytosterolen im Spurenbereich geeignet.

Bei Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, die auf Basis des Signal/Rausch-Verhältnisses bestimmt worden sind, muss jedoch immer auch berücksichtigt werden, dass das Peak-Rausch-Verhältnis in einem Chromatogramm von dem aktuellen Zustand der GC/MS-Anlage und den experimentellen Bedingungen wie zum Beispiel Reinheit der Lösungsmittel abhängt (152). Dies schränkt die direkte Vergleichbarkeit des Nachweisvermögens verschiedener Analyseverfahren ein. Um optimale Analyseergebnisse zu erzielen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Zustand des Gerätes vor jeder Sequenz überprüft und ein Tuning des MS durchgeführt. Bei Nachlassen der Empfindlichkeit des MS wurde die Ionenquelle gereinigt und gegebenenfalls die Filamente gewechselt.

Die Nachweisgrenzen der GC/MS-Methode zur Bestimmung von deuteriertem Cholesterol und nicht-markiertem Cholesterol lagen, bezogen auf die Konzentration in der Serumprobe, bei 7 µg/dl für D₆-Cholesterol und 15 µg/dl für Cholesterol. Das Nachweisvermögen der Methode, bezogen auf die Konzentration im Serum, war damit im Vergleich zu den Analysemethoden für die Phytosterole geringer. Dies lag daran, dass die extrahierten Sterole aufgrund des hohen Anteils an natürlichem Cholesterol für die GC/MS-Analyse stark verdünnt wurden.

6.1.4 Linearität

Für alle Sterole konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal in den überprüften Konzentrationsbereichen bestätigt werden. Für Cholesterolkonzentrationen im Bereich von 0-363 mg/dl zeigte die Beziehung zwischen Konzentration und Signal zunächst eine bessere Anpassung an eine Kalibrierfunktion 2. Grades ($y = a + bx + cx^2$) (Kapitel 5.1.3). Dies lag nach Angaben des Herstellers des GC/MS an der Funktionsweise des MS bzw. des Multipliers (Agilent, mündliche Mitteilung).

Generell ist das Ermitteln von Konzentrationen auch über eine Kalibrierfunktion 2. Grades möglich. Die Rechenverfahren sind aber bei einem linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Signal einfacher. Da keine Cholesterolkonzentrationen unter 80 mg/dl in den Serumproben zu erwarten waren, wurde der Cholesterolkonzentrationsbereich auf 80-363 mg/dl eingengt. Für diesen Bereich war ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,9988 gegeben. Die Einengung des Konzentrationsbereichs hatte jedoch zur Folge, dass sich der y-Achsenabschnittsparameter b nun signifikant von Null unterschied, da die unteren Konzentrationen nicht mehr berücksichtigt wurden. Die Einhaltung des Linearitätskriteriums, dass sich der y-Achsenabschnitt nicht signifikant von Null unterscheiden darf (150), ist jedoch nicht zwingend notwendig, da (a) mit einem Bestimmtheitsmaß mit 0,999 eine ausreichende Anpassung der linearen Gerade an die Punkte gegeben ist, (b) anschließend keine Einpunkt-Kalibrierung durchgeführt wurde und (c) die Cholesterolkonzentrationen in den Studienproben nicht außerhalb des angegebenen linearen Bereichs der Kalibriergerade bestimmt wurden.

Die nachfolgende Anwendung der Methoden für die Analyse der Serumproben zeigte, dass die Arbeitsbereiche der Kalibriergeraden (Konzentrationsbereich zwischen unterstem und oberstem Kalibrierpunkt) für die natürlichen pflanzlichen Sterole nach oben etwas zu eng

gewählt worden waren. Idealerweise sollten die Konzentrationen in der Mitte der jeweiligen Kalibriergeraden ermittelt werden (152). Die Ergebnisse der Prüfung der Richtigkeit im Rahmen der Validierung machen jedoch deutlich (**Tabelle 5.4**), dass auch oberhalb des höchsten Kalibrierpunktes ermittelte Campesterol- und Sitosterolkonzentrationen die Kriterien für die Richtigkeit erfüllten. Die außerhalb des Arbeitsbereiches ermittelten Konzentrationen wurden daher nicht aus dem Datenset entfernt. Die Konzentrationen der deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol wurden in allen Serumproben innerhalb des linearen Arbeitsbereiches der Kalibriergeraden bestimmt und bestätigen die jeweils gewählten Arbeitsbereiche.

6.1.5 Präzision

Die Prüfung der Intra-Assay- und Inter-Assay-Präzision ergab für alle Sterole und Konzentrationsstufen sehr gute Ergebnisse. Die Variationskoeffizienten der Methoden lagen größtenteils unter 10 % und damit deutlich unter den von der FDA geforderten 15 %. Einzige Ausnahme war die Intra-Assay-Variation der HPLC-GC/MS-Bestimmung von D₆-Campesterol auf dem untersten Konzentrationslevel (Variationskoeffizient von 15,5 %) (**Tabelle 5.4**). Nach Horwitz nimmt die Streuung von Analyseergebnissen mit abnehmender Analytkonzentration zu (160). Angesichts der niedrigen D₆-Campesterol-Konzentration (0,28 µg/dl) war ein Variationskoeffizient von 15,5 %, der nur knapp die 15 %-Marke überschritt, daher akzeptabel. Insgesamt war die Bestimmung der deuterierten Sterole mit größeren Schwankungen behaftet als die Bestimmung der entsprechenden nichtmarkierten Sterole. Dieses lässt sich durch die Tatsache, dass die deuterierten Sterole in sehr viel geringeren Konzentrationen im Serum vorlagen, erklären.

Die GC/MS-Methode nach Prange (Ausgangsmethode) weist eine Intra-Assay-Präzision von 3 % sowohl für die Bestimmung von Campesterol (0,175 mg/dl) als auch Sitosterol (0,127 mg/dl) auf; die Inter-Assay-Präzision liegt bei 8 % für Campesterol und 7 % für Sitosterol (144). Die Präzision der in der vorliegenden Arbeit aufgebauten HPLC-GC/MS-Methode zur Bestimmung der deuterierten und natürlichen Phytosterole ist geringfügig niedriger (Intra-Assay-Präzisionen für Campesterol und Sitosterol zwischen 5 % und 8 % und Inter-Assay-Präzision bei 12 % für Campesterol und 11 % für Sitosterol). Durch die Fraktionierung der Sterole mittels HPLC enthält die Methode einen zusätzlichen Aufarbeitungsschritt. Es ist

nachvollziehbar, dass sich mit der Anzahl an Aufarbeitungsschritten auch die potentiellen Fehlerquellen erhöhen und die Bestimmungen der Phytosterole mittels HPLC-GC/MS daher mit etwas höheren Schwankungen behaftet sind. Da der interne Standard Epicoprostanol erst der abgetrennten Phytosterolfraction zugegeben wird, können Sterolverluste vor Zugabe des internen Standards nur durch eine möglichst exakte Arbeitsweise ausgeglichen werden. Angesichts dessen ist es sogar bemerkenswert, dass die Phytosterolanalysen mittels HPLC-GC/MS so präzise sind.

Um den Einfluss der Inter-Assay-Schwankungen der Methoden auf die intra-individuellen Änderungen der Serumsterolkonzentrationen zu minimieren, wurden die vier Serumproben eines Studienteilnehmers immer zusammen in einer Probensequenz analysiert. Durch Mehrfachbestimmungen ließe sich die Präzision weiter erhöhen. Die Standardabweichung verhält sich indirekt proportional zur Anzahl der Messungen ($s \sim 1/\sqrt{n}$) (161). Mehrfachbestimmungen sind jedoch aufwendiger. Es muss für zukünftige Studien abgeschätzt werden, ob Mehrfachbestimmungen im entsprechenden Verhältnis zum Nutzen (z.B. weniger Studienteilnehmer notwendig, um einen signifikanten Unterschied zwischen Mittelwerten festzustellen) stehen.

6.1.6 Richtigkeit

Systematische Fehler (Richtigkeit) und zufällige Fehler (Präzision) grenzen die Genauigkeit einer Messung ein. Die Begriffe Richtigkeit (engl. trueness) und Genauigkeit (engl. accuracy) werden häufig synonym verwendet. Die Richtigkeit einer Methode beschreibt die Übereinstimmung des erhaltenen Analysenwertes (Mittelwertes) mit einem als richtig akzeptierten Wert. Die Genauigkeit ist der Überbegriff für Richtigkeit und Präzision und stellt im Rahmen einer Validierung keinen eigenen Prüfpunkt dar (152).

Die Prüfung auf Richtigkeit der Methoden ergab, dass die gemessenen Werte für alle Konzentrationsniveaus und Sterole in dem von der FDA vorgegebenen Bereich von 85-115 % des Sollwertes lagen. Größtenteils wichen sie weniger als 10 % von einer 100 %-Übereinstimmung ab (**Tabelle 5.4**). Letztlich ist mit dem Nachweis der Richtigkeit auch bewiesen, dass die Methode selektiv ist. Denn nur eine selektive Methode kann richtige Ergebnisse liefern.

Für die HPLC-GC/MS-Methode zur Bestimmung der Phytosterole sind die Richtigkeitswerte unter 100 % möglicherweise auf Substanzverluste vor Zugabe des internen Standards zurück-

zuführen. Analog zur Ausgangsmethode wurde Epicoprostanol als interner Standard verwendet. Da Epicoprostanol viel früher als die Phytosterole von der HPLC-Säule eluierte und damit nicht in der Phytosterolfraktion enthalten gewesen wäre, wurde es erst nach der HPLC der abgetrennten Phytosterolfraktion zugegeben. Eventuelle minimale Substanzverluste, die davor auftraten, konnten damit nicht durch den internen Standard ausgeglichen werden. Da jedoch davon auszugehen ist, dass der mögliche Verlust der markierten Sterole identisch ist mit dem der natürlichen Sterole, ist auch davon auszugehen, dass die Konzentrationsquotienten von deuterierten zu natürlichen Sterolen durch mögliche Verluste nicht beeinflusst wurden.

Eine theoretische Alternative wäre gewesen, bei der Fraktionierung nur den Cholesterolanteil der Probe zu verwerfen und alle anderen Bestandteile inklusive Epicoprostanol aufzufangen. Dieses war jedoch nicht umsetzbar, da das Volumen der weiterzuverarbeitenden Fraktion (rund 140 ml!) nicht mehr handhabbar gewesen wäre. Die akzeptable Obergrenze stellte ein Fraktionsvolumen von 20 ml dar, was bei einem Fluss von 3 ml/min einer Sammelzeit von 6 Minuten und 40 Sekunden entsprach. Zentrifugengläser mit einem größeren Fassungsvermögen als 20 ml waren für das Rack des Fraktionssammlers nicht verfügbar. Zudem hätte das Eindampfen eines größeren Volumens übermäßig viel Zeit in Anspruch genommen.

Für die Bestimmung der Phytosterole wurden daher Maßnahmen ergriffen, um den Sterolverlust vor Zugabe des Epicoprostanols möglichst gering zu halten. So wurden die Sterolreste, die in den für die Aufarbeitung verwendeten Vials und Zentrifugenröhrchen verblieben, wieder der Probe zugeführt. Außerdem wurde eine Kalibrierung in Serummatrix vorgenommen, um für die Kalibrier- und Serumproben vergleichbare Extraktionsbedingungen zu gewährleisten. Die Validierungsergebnisse zeigen, dass durch diese Maßnahmen, trotz der späteren Zugabe des internen Standards, eine valide Messung der natürlichen und deuterierten Phytosterole möglich war. Da die Maßnahmen zur Verringerung des Sterolverlustes jedoch recht aufwendig sind, wurden noch weitere Substanzen getestet, die als interner Standard bereits zu Beginn der Aufarbeitung der Probe zugesetzt werden können. Dazu gehörten:

- Δ^4 -2,2,3,4,6,6- D_6 -Campesterol/ Δ^4 -2,2,3,4,6,6- D_6 -Sitosterol (eigene Synthese)
- D_6 -Cholestanol (eigene Synthese aus D_6 -Cholesterol von CDN Medical Isotopes)
- Coprostanol (Sigma)
- D_6 -Campestanol (eigene Synthese aus D_6 -Sitosterol/ D_6 -Campesterol von Sugaris)

Mittels 1-Minuten-Fraktionierung von Standardlösungen dieser Substanzen an der HPLC wurde überprüft, ob die Substanzen mit ihrer Retentionszeit in die Phytosterolfraktion fallen.

Mittels GC/MS wurde untersucht, ob die Sterole bzw. Stanole rein waren, das heißt kein Campesterol und Sitosterol in natürlicher und deuterierter Form enthielten.

Die Verwendung von deuteriertem Campestanol als internem Standard erwies sich von allen als interne Standards getesteten Substanzen als der beste Ansatz. Deuteriertes Campestanol hat eine optimale Retentionszeit und konnte komplett mit der Phytosterolfraction aufgefangen werden. Die massenspektrometrische Analyse zeigte jedoch, dass der synthetisierte Standard nicht rein genug war und auch die deuterierten Phytosterole D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol enthielt. Somit erfüllte er nicht die Bedingungen für einen internen Standard. Eine Aufreinigung des Standards mittels HPLC war im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht möglich, stellt aber einen vielversprechenden Ansatz für die Zukunft dar, um die Methode zu vereinfachen und für die Routineanwendung zu optimieren.

6.2 Ergebnisse der klinischen Studie

Bisherige Studien zeigen, dass der Cholesterolsresorptionshemmer Ezetimib die Cholesterolsresorption beim Menschen senkt (12, 120) und der HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin die endogene Cholesterolsynthese vermindert (162). Die Wirkung einer Kombinationstherapie mit Ezetimib plus Simvastatin auf die Cholesterolsresorption und Cholesterolsynthese ist bisher noch nicht untersucht worden. In einer in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn durchgeführten placebokontrollierten klinischen Studie wurde daher die Cholesterolsresorption und Cholesterolsynthese unter Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib und unter der jeweiligen Monotherapie mit Simvastatin bzw. Ezetimib gemessen. In den im Rahmen dieser Studie asservierten Serumproben der Studienteilnehmer wurden die zur Bestimmung der Sterolsresorption nach Lütjohann *et al.* (39) oral verabreichten sechsfach-deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol sowie die entsprechenden natürlich vorkommenden Sterole Cholesterol, Campesterol und Sitosterol quantifiziert. Dazu wurden die in der vorliegenden Arbeit entwickelten und validierten GC/MS-Methoden angewendet. Im folgenden, zweiten Teil der Diskussion richtet sich der Fokus auf die in den Serumproben ermittelten Sterolkonzentrationen und deren Zusammenhang mit der Sterolsresorption.

6.2.1 Natürliche und deuterierte Serumsterole

Cholesterol

Die in der vorliegenden Studie mittels GC/MS unter Placebo gemessenen mittleren Konzentrationen für Cholesterol (253 mg/dl), Campesterol (0,559 mg/dl), Sitosterol (0,318 mg/dl) sind vergleichbar mit den in anderen Studien ermittelten Sterolkonzentrationen für Patienten mit leichter bis moderater Hypercholesterolämie (12, 37, 50, 163). Ebenso stimmen die ermittelten Änderungen der Cholesterolkonzentrationen nach der Behandlungsphase mit Simvastatin (-28 %), Ezetimib (-14 %) unter Simvastatin plus Ezetimib (-40 %) gegenüber Placebo mit den in vorhergehenden Studien beobachteten Änderungen der Gesamtcholesterolkonzentration unter Simvastatin (164), Ezetimib (12) und Simvastatin plus Ezetimib (165, 166) überein.

Phytosterole

Die Serumkonzentrationen der Phytosterole Campesterol und Sitosterol änderten sich durch die siebenwöchige Behandlung mit Simvastatin nicht signifikant. Zur Wirkung von Statinen auf die Phytosterolkonzentrationen bei hypercholesterolämischen Patienten lieferten bisherige Studien keine einheitlichen Schlussfolgerungen (siehe Übersichtsarbeit von Chan *et al.* (50)). Speziell in Bezug auf die Wirkung von Simvastatin war in einer Studie bei 105 Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen nach achtwöchiger Simvastatin-Behandlung eine mittlere Reduktion der Phytosterole im Serum um rund 10 % zu beobachten. Nach weiteren 10 Monaten waren die Phytosterolkonzentrationen wieder angestiegen, lagen aber immer noch unter dem Ausgangswert (167). Bei einer untersuchten Untergruppe von Koronarpatienten aus der 4S-Studie führte eine Langzeittherapie mit Simvastatin über 5 Jahre zu einem Anstieg der Phytosterole von normalen Werten unter 1 mg/dl auf bis zu 2,8 mg/dl für Sitosterol und 1,5 mg/dl für Campesterol (168). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Serumkonzentrationen der pflanzlichen Sterole durch die Hemmung der Cholesterolsynthese mit Simvastatin zunächst abfallen und dann allmählich ansteigen. Auf die möglichen zugrunde liegenden Mechanismen wird später noch im Zusammenhang mit den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole eingegangen (Kapitel 6.2.3).

In der vorliegenden Studie senkte Ezetimib die pflanzlichen Sterole im Serum stärker (-68 % für Campesterol und -59 % für Sitosterol) als in einer vergleichbaren Studie zur Wirkung von Ezetimib von Sudhop *et al.* (12) (-48 % für Campesterol und -41 % für Sitosterol). Diese Unterschiede können auf den längeren Behandlungszeitraum mit Ezetimib (sieben Wochen gegenüber zwei Wochen) zurückgeführt werden. Eigene Langzeituntersuchungen haben gezeigt,

dass die zusätzliche Gabe von Ezetimib zu einer fortlaufenden Therapie mit Atorvastatin die pflanzlichen Sterole bis zu sechs Monate kontinuierlich senkt (169).

Simvastatin als Monotherapie bewirkte gegenüber Placebo keine signifikante Änderung der Phytosterolkonzentrationen. Dennoch führte die Gabe von Simvastatin in Kombination mit Ezetimib im Vergleich zur Monotherapie mit Ezetimib zu signifikant niedrigeren Phytosterolkonzentrationen im Serum. Das heißt, dass Ezetimib und Simvastatin gemeinsam verabreicht eine synergistische Wirkung auf die Konzentration der pflanzlichen Sterole im Serum haben. Bislang gibt es keine Studien, in denen die Wirkung einer Kombinationstherapie mit einem Statin und Ezetimib auf die Phytosterolkonzentrationen von Hypercholesterolämiepatienten untersucht wurde. Eine synergistische Wirkung von Ezetimib und Simvastatin würde dafür sprechen, dass auch Phytosterolämiepatienten von einer Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib profitieren könnten. Dabei muss jedoch auch der erwähnte beobachtete Anstieg der Phytosterole unter Langzeitherapie mit Statinen (168, 170) berücksichtigt werden. Dadurch könnte die synergistische Wirkung von Simvastatin plus Ezetimib auf die pflanzlichen Sterole im Serum bei einer längeren Kombinationstherapie aufgehoben werden. Bisher ist Ezetimib nur als Monotherapie zur Behandlung der Phytosterolämie zugelassen.

Deuterierte Serumsterole

Bisher liegen keine vergleichbaren Studien vor, in denen die Konzentrationen der deuterierten Sterole D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol und D₆-Cholesterol nach einwöchiger oraler Gabe im Serum von Hypercholesterolämiepatienten bestimmt wurden. Daher wurden die zu erwartenden Konzentrationen theoretisch auf Basis von für die natürlichen Sterole publizierten Studienergebnissen berechnet (siehe Kapitel 4.1.1). Die gemessenen mittleren (nicht-dosiskorrigierten) Konzentrationen der deuterierten Sterole im Serum unter Placebo (213 µg/dl für D₆-Cholesterol, 12,0 mg/dl für D₆-Campesterol und 3,4 µg/dl für D₆-Sitosterol) stimmten gut mit den zuvor theoretisch ermittelten Erwartungswerten überein (229 µg/dl für D₆-Cholesterol, 16 mg/dl für D₆-Campesterol und 6 µg/dl für D₆-Sitosterol). Da davon auszugehen ist, dass nach einer Woche der Kapseleinnahme die deuterierten Sterole im Serum noch keinen Steady-State erreicht haben, lagen die Messwerte insgesamt etwas niedriger als die berechneten Werte.

Die Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole korrelierten in allen Behandlungsphasen höchst signifikant mit der Konzentration ihres entsprechenden natürlichen Sterols. Das Verhältnis der D₆-Phytosterole zu ihrem natürlichen Phytosterol änderte sich zwischen den vier Behandlungsphasen nicht signifikant (**Abbildung 5.12**). Dies zeigt, dass die deuterierten und

natürlichen Phytosterole weitgehend im selben Ausmaß in den Behandlungsphasen geändert wurden. Auf den Quotienten D₆-Cholesterol/Cholesterol ergab sich für den Faktor Medikation jedoch einen signifikanten Einfluss (**Abbildung 5.12**). Dies verdeutlicht, dass die Serumkonzentrationen von D₆-Cholesterol und Cholesterol zwar miteinander korrelierten, sich aber nicht in gleichem Ausmaß zwischen den verschiedenen Behandlungen änderten. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass das natürliche Cholesterol im Gegensatz zum D₆-Cholesterol auch endogen synthetisiert werden kann.

In der vorliegenden Studie wurde mittels statistischen Tests kein signifikanter Carry-Over-Effekt der deuterierten Sterole von einer Behandlungsphasen in die nächste festgestellt. Zwischen den einwöchigen Einnahmephasen der deuterierten Sterole lagen insgesamt sechs Wochen, in denen aber bereits die Medikamente verabreicht wurden. In einer eigenen Untersuchung im Rahmen einer anderen Studie, waren nach einer zweiwöchigen Auswaschphase noch rund 30 % der D₆-Cholesterolkonzentration und jeweils rund 16 % der D₆-Campesterol- und D₆-Sitosterolkonzentration im Serum zu messen (Daten nicht veröffentlicht). Die deuterierten Sterole waren in vergleichbarer Menge und über eine Woche an insgesamt 18 Probanden verabreicht worden. Es ist daher davon auszugehen, dass die deuterierten Sterole in der vorliegenden Studie in dem sechswöchigen Intervall bis zur nächsten Einnahme weitestgehend aus dem Serum verschwunden waren.

6.2.2 Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese

Da die Serumsterole in der vorliegenden Arbeit mit den Cholesterolresorptions- und Cholesterolsyntheseergebnissen aus der klinischen Studie verglichen wurden, wird im Folgenden auch in Kürze auf die Wirkungen der Medikamente auf die Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese eingegangen.

Die mittlere Cholesterolresorptionsrate der 33 Studienteilnehmer mit Hypercholesterolämie wurde durch die siebenwöchige Behandlung mit Ezetimib signifikant von $50,0 \pm 9,6$ % unter Placebo auf $21,3 \pm 10,9$ % gesenkt. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Resultat der Studie von Sudhop *et al.* sehr gut überein. In dieser wurde bei 18 Hypercholesterolämiepatienten ebenso mittels der *continuous feeding dual stable isotope method* eine Cholesterolresorption von $49,8 \pm 13,8$ % unter Placebo und von $22,7 \pm 25,8$ % nach zweiwöchiger Behandlung mit Ezetimib ermittelt (12). Die Untersuchung von Sudhop *et al.* (12) ist die bisher einzige klinische Studie, in der bei Patienten mit Hypercholesterolämie die Wirkung von Ezetimib auf die

Cholesterolesorption untersucht wurde. Eine erst kürzlich publizierte Studie von Clarenbach *et al.* zeigte jedoch, dass bei Vegetariern, die nur sehr wenig Cholesterol mit der Nahrung aufnehmen (rund 30 mg/d), eine zweiwöchige Ezetimibbehandlung zu einer vergleichbaren Reduktion der Cholesterolesorption und LDL-Cholesterolkonzentration im Serum führt wie bei Hypercholesterolämiepatienten (120). Es ist daher davon auszugehen, dass der lipidsenkende Effekt von Ezetimib vor allem durch die Hemmung der Resorption von endogenem (biliärem) Cholesterol vermittelt wird.

Durch die siebenwöchige Behandlung mit Simvastatin änderte sich die Cholesterolesorption nicht signifikant gegenüber Placebo. Bisher durchgeführte Untersuchungen mit anderen Statinen lieferten kein eindeutiges Ergebnis zur Wirkung von Statinen auf die Cholesterolesorption (126-129). Gründe hierfür sind sicherlich unter anderem die unterschiedlichen Methoden, die zur Bestimmung der Cholesterolesorption verwendet wurden, sowie unterschiedliche Probandenkollektive, an denen die Untersuchungen durchgeführt wurden.

Die Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib hatte eine vergleichbare Wirkung auf die Cholesterolesorption wie die Monotherapie mit Ezetimib. Dies weist darauf hin, dass Simvastatin und Ezetimib bei einer Kombinationsgabe ihre jeweilige unabhängige Wirkung auf die Cholesterolesorption bewahren.

Die mittlere Cholesterolsyntheserate der Studienteilnehmer wurde mittels der *fecal balance*-Methode bestimmt und lag bei 876 ± 342 mg/d unter der Behandlung mit Placebo. Durch die Behandlung mit Ezetimib stieg sie auf 1896 ± 642 mg/d an gegenüber Placebo. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen für die Cholesterolsynthese der schon genannten Studie von Sudhop *et al.* (12) überein (Placebo: 931 ± 1027 mg/d und Ezetimib: 1763 ± 1098 mg/d; $n = 18$). Auch Clarenbach *et al.* berichteten in ihrer Studie mit Vegetariern (120) von einem Anstieg der Cholesterolsynthese unter der Behandlung mit Ezetimib. Sie wiesen darauf hin, dass der Anstieg der Cholesterolsynthese wahrscheinlich eine physiologische Reaktion darstellt, um den unter Ezetimib hervorgerufenen Verlust an neutralen Sterolen zu kompensieren. Erwartungsgemäß wurde die Cholesterolsynthese der Studienteilnehmer sowohl durch die Monotherapie mit Simvastatin gegenüber Placebo als auch durch die Kombinationstherapie mit Simvastatin plus Ezetimib gegenüber der Monotherapie mit Ezetimib vermindert.

Unter der Behandlung mit Simvastatin, das heißt während die Cholesterolsynthese gehemmt wurde, war die Cholesterolkonzentration im Serum der Studienteilnehmer signifikant positiv mit der Cholesterolesorption assoziiert (**Tabelle 5.8**). Dies zeigt, dass die Cholesterolsynthese in den anderen Behandlungsphasen einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung

der Cholesterollhomöostase im Blut leistet. In der Tat korrelierte die Cholesterolsynthese in der vorliegenden Studie in allen Behandlungsphasen signifikant negativ mit der Cholesterolresorption (Daten nicht gezeigt). Damit wird bestätigt, dass die Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese beim Menschen interagieren (171).

6.2.3 Zusammenhang zwischen der Cholesterolresorption und den Serumsterolen

Wie in der vorliegenden Studie konnten in den letzten Jahren durch den Einsatz der *continuous feeding dual stable isotope method* nach Lütjohann *et al.* (39) in einer Vielzahl von Studien Informationen über die Cholesterolresorption gewonnen werden (12, 52, 142). Die Methode hat jedoch auch Nachteile. Die Stuhlproben müssen für die GC/MS-Analyse in mehreren Schritten aufgearbeitet werden. Neben D₆-Cholesterol müssen auch die Stoffwechselprodukte, die bei der bakteriellen Metabolisierung von D₆-Cholesterol entstanden sind, mitanalysiert werden. Die Analytik der fäkalen Sterole ist damit recht arbeitsintensiv. Sie wird vom Laborpersonal zudem häufig aufgrund des Probenmaterials als unangenehm empfunden. Außerdem ist das regelmäßige Sammeln von Stuhlproben sehr aufwendig und setzt eine gute Compliance der Probanden voraus. Da die Cholesterolresorption wesentlich zur Regulation der Cholesterollhomöostase im Serum beiträgt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass zwischen den Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol und der Cholesterolresorption ein Zusammenhang besteht.

In der Tat korrelierten die Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol in der Placebo-Phase höchst signifikant mit der Cholesterolresorptionsrate der Studienteilnehmer (**Tabelle 5.8**). Um den Einfluss schwankender Lipoproteinkonzentrationen auf die deuterierten Sterole im Serum zu eliminieren, wurden die Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole jeweils auch im Verhältnis zum Gesamtcholesterol ausgedrückt. Die cholesterol-standardisierte D₆-Campesterolkonzentration korrelierte unter Placebo am stärksten mit der Cholesterolresorptionsrate ($r = 0,731$, $n = 33$), gefolgt von der absoluten D₆-Campesterolkonzentration ($r = 0,715$, $n = 33$) und der cholesterol-standardisierten D₆-Cholesterolkonzentration ($r = 0,640$; $P < 0,001$ und $n = 33$ für alle). Dass der Zusammenhang dabei für D₆-Campesterol höher war als für D₆-Cholesterol, mag daran liegen, dass D₆-Cholesterol durch den endogenen Cholesterolmetabolismus beeinflusst wurde. Die pflanzlichen Sterole werden hingegen im Körper weder metabolisiert noch synthetisiert (37).

Von allen Serumsterolen reflektierten die Änderungen der cholesterol-standardisierten D₆-Cholesterolkonzentration (D₆-Cholesterol/Cholesterol) die Änderungen der Cholesterolresorption am besten. Die cholesterol-standardisierte D₆-Cholesterolkonzentration im Serum wurde unter der Behandlung mit Simvastatin um $+7,5 \pm 17 \%$ ($P = 0,037$), unter der Behandlung mit Ezetimib um $-52 \pm 9 \%$ ($P < 0,001$) und unter der Behandlung mit Simvastatin plus Ezetimib um $-47 \pm 13 \%$ ($P < 0,001$) verändert gegenüber Placebo (**Abbildung 5.8**). Diese mittleren Änderungen spiegelten die Änderungen der Cholesterolresorption in diesen Behandlungsphasen gegenüber Placebo nicht nur qualitativ sondern nahezu quantitativ wider (Simvastatin: $+7,0 \pm 19 \%$; $P = 0,051$; Ezetimib: -57 ± 21 , $P < 0,001$; Simvastatin plus Ezetimib: -52 ± 24 ; $P < 0,001$; **Abbildung 5.4**). Der Quotient D₆-Cholesterol/Cholesterol im Serum zeigte außerdem an, dass Simvastatin plus Ezetimib keine signifikant stärker senkende Wirkung auf die Cholesterolresorption hat als Ezetimib. Unter Simvastatin erreichte der Anstieg des Quotienten D₆-Cholesterol/Cholesterol zwar Signifikanzniveau ($+7,5\%$; $P = 0,037$) im Gegensatz zur Cholesterolresorption ($+7,0 \%$; $P = 0,051$). Die Tendenz der Änderung der Cholesterolresorption spiegelte der Quotient D₆-Cholesterol/Cholesterol von allen Serumsterolen dennoch am besten wider.

Die Korrelation zwischen dem D₆-Cholesterol/Cholesterol-Quotienten im Serum mit der Cholesterolresorption war auch in der Simvastatin-Phase höchst signifikant ($r = 0,574$; $P < 0,001$; $n = 33$). Die Regressionsgerade, die den Zusammenhang zwischen beiden Variablen unter der Behandlung mit Simvastatin darstellte, verlief nahezu deckungsgleich zu der entsprechenden Regressionsgeraden unter Placebo. In den Behandlungsphasen mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib bestand hingegen keine signifikante Korrelation zwischen dem D₆-Cholesterol/Cholesterol-Quotienten und der Cholesterolresorption. Die Regressionsgeraden verliefen zwar auch beide deckungsgleich. Sie wiesen dabei jedoch eine signifikant niedrigere Steigung auf als die Regressionsgeraden in den Behandlungsphasen mit Placebo und Simvastatin (**Abbildung 5.14**).

Bei Betrachtung der individuellen Änderungen wurde in diesem Zusammenhang deutlich, dass die Wirkung von Ezetimib allein und auch in Kombination mit Simvastatin auf die Cholesterolresorption erhebliche interindividuelle Schwankungen aufwies (interindividueller Variationskoeffizient der Änderungen: 36% unter Ezetimib und 45% unter Simvastatin plus Ezetimib, **Abbildung 5.5**). Im Gegensatz dazu schwankte die Änderung des D₆-Cholesterol/Cholesterol-Quotient nur rund halb so stark (interindividueller Variationskoeffizient der Änderung: 18% unter Ezetimib und 27% unter Simvastatin plus Ezetimib, **Abbildung 5.10**). Die durch Ezetimib gegenüber Placebo ausgelösten individuellen prozentu-

alen Änderungen der Cholesterolresorptionsrate und des Serumquotienten korrelierten nicht miteinander. Gleiches galt für die prozentualen Änderungen der beiden Variablen unter Simvastatin plus Ezetimib. Folglich mussten auch die Regressionsgeraden unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib einen anderen Verlauf aufzeigen als unter Placebo. Sudhop *et al.* hatten in ihrer Studie (12) auch eine hohe interindividuelle Variabilität bei der Wirkung von Ezetimib auf die Cholesterolresorption (bestimmt mittels *continuous feeding dual stable isotope method* nach Lütjohann *et al.* (39)) beobachtet. Die Ursache konnte von ihnen anhand der Studienergebnisse nicht ausgemacht werden. In der vorliegenden Studie war jedoch festzustellen, dass die mittlere Cholesterolresorption der Studienteilnehmer unter Placebo und Simvastatin, das heißt im höheren Bereich, nur um 19 % bzw. 17 % schwankte. Unter der Behandlung mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib, das heißt im unteren Bereich, wies sie hingegen mit 51 % bzw. 43 % einen deutlich höheren inter-individuellen Variationskoeffizienten auf. Die inter-individuelle Schwankung des D₆-Cholesterol/Cholesterol-Quotienten im Serum lag im Gegensatz dazu in allen vier Behandlungsphasen zwischen 24 % und 29 %. Dies weist darauf hin, dass möglicherweise nicht offensichtliche methodische Probleme bei der Bestimmung niedriger Cholesterolresorptionsraten nach der Methode von Lütjohann *et al.* vorliegen. Dies ist jedoch nur eine Vermutung, die bisher nicht systematisch überprüft wurde. Es sind außerdem auch zukünftige Untersuchungen geplant, um herauszufinden, welche Unterschiede zwischen Ezetimib-Respondern und Nicht-Respondern bestehen. Diese werden dazu beitragen, die hohen inter-individuellen Schwankungen der Cholesterolresorption unter der Behandlung mit Ezetimib zu erklären.

Zwischen den Serumsterolen (absolut und cholesterol-standardisiert) und der Cholesterolsynthese bestand in allen vier Behandlungsphasen ein negativer Zusammenhang. Die Korrelation war am stärksten für D₆-Campesterol/Cholesterol und D₆-Cholesterol/Cholesterol (**Tabelle 5.9**). Die Regressionsgeraden in den Behandlungsphasen verliefen spiegelbildlich zu den Regressionsgeraden, die den Zusammenhang zwischen den Serumsterolen und Cholesterolresorption wiedergaben. Dies zeigt wiederum, dass die Cholesterolresorption und Cholesterolsynthese interagieren. Eine hohe Serumkonzentration der deuterierten Sterole ist damit mit einer hohen Cholesterolresorption und niedrigen Cholesterolsynthese assoziiert. Umgekehrt weist eine niedrige Serumkonzentration der deuterierten Sterole auf eine niedrige Cholesterolresorption und eine hohe Cholesterolsynthese hin.

Die absolute Serumkonzentration von D₆-Cholesterol sowie die absoluten und cholesterolstandardisierten Serumkonzentrationen von D₆-Campesterol, D₆-Sitosterol, Campesterol und Sitosterol reflektierten, dass Ezetimib die Cholesterolresorption hemmt. Unter dem Einfluss von Simvastatin als Monotherapie oder in Kombinationstherapie mit Ezetimib spiegelten sie die Änderung der Cholesterolresorption jedoch weniger gut wider als der Serumquotient D₆-Cholesterol/Cholesterol. So sanken die absoluten Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole unter Simvastatin gegenüber Placebo ab, obwohl Simvastatin nicht die Cholesterolresorption hemmt. Wie ist dies zu begründen?

Zunächst lässt sich diese Beobachtung mit der lipidsenkenden Wirkung von Simvastatin erklären. Diese beruht darauf, dass durch die Hemmung der endogenen Cholesterolsynthese in der Leberzelle der Gehalt an natürlichem Cholesterol in der Zelle sinkt. Dadurch werden die LDL-Rezeptoren an der Oberfläche der Leber hoch reguliert und Cholesterol folglich verstärkt in Form von LDL-Partikeln aus der Blutzirkulation in die Leber aufgenommen (89). Weiter wird das Cholesterol vermindert in Form von Lipoproteinpartikeln aus der Leber in die Blutzirkulation abgegeben (172). Es gibt außerdem Hinweise, dass auch die biliäre Sekretion von Cholesterol durch Statine leicht vermindert wird (128, 129). Diese kompensatorischen Mechanismen führen zu einem neuen Steady-State, der durch eine niedrigere LDL- und Gesamtcholesterolkonzentration im Blut charakterisiert ist. Es liegt daher nahe, dass unter der Therapie mit Simvastatin, aufgrund der verminderten Anzahl an zirkulierenden Lipoproteinen, auch die Konzentrationen der deuterierten Sterole im Serum sanken.

Es erklärt jedoch nicht, warum die Verminderung bei D₆-Campesterol deutlich geringer war (-6 %, $P = 0,014$) als bei D₆-Cholesterol (-23 %, $P < 0,001$) und bei D₆-Sitosterol kein Signifikanzniveau (-1 %; $P = 0,391$) erreichte. Die Serumkonzentrationen der natürlichen Phytosterole waren nach der Behandlung mit Simvastatin auch nicht signifikant verändert. Daraus kann gefolgert werden, dass die unter Simvastatin-Behandlung in geringerer Anzahl zirkulierenden Lipoproteine größere Mengen Phytosterole enthalten als unter Placebo. Ursache für eine stärkere „Beladung“ der Lipoproteinpartikel mit Phytosterolen kann sein, dass unter Statintherapie nicht nur die Ausscheidung von Cholesterol (127-129) sondern auch die der pflanzlichen Sterole aus der Leber reduziert wird. Diese Annahme wird von mehreren Studienergebnissen gestützt, die zeigen, dass die biliären Sekretionsraten von Cholesterol und pflanzlichen Sterolen bei gesunden Probanden miteinander korrelieren (52) und die Phytosterolkonzentrationen im Plasma invers mit der Cholesterolsekretion assoziiert sind (173). Es ist außerdem bekannt, dass unter physiologischen Bedingungen Sitosterol schneller ausgeschieden wird als Campesterol und Campesterol schneller als Cholesterol (52). Es ist möglich, dass

eine Hemmung der biliären Sterolausscheidung durch Simvastatin folglich dazu führte, dass die Phytosterole und insbesondere Sitosterol in kurzer Zeit verhältnismäßig stärker in der Leber anstiegen als Cholesterol, dessen Gehalt durch die Synthesehemmung in der Leberzelle vermindert ist. Die verhältnismäßig stärkere Anreicherung der Phytosterole in der Leber und das durch die Cholesterolsynthesehemmung ausgelöste geringe Bestreben der Leber, Cholesterol in die Zirkulation abzugeben, haben damit zur Folge, dass die aus der Leber in die Zirkulation abgegebenen Lipoproteinpartikel besonders phytosterolreich sind. Diese These wird durch eine Studie von Miettinen *et al.* unterstützt, in der der Gehalt der natürlichen Phytosterole in allen Lipoproteinen unter der sechsmonatigen Therapie mit Atorvastatin anstieg (128).

Zusammenfassend ist damit davon auszugehen, dass die Serumkonzentrationen der deuterierten und natürlichen Phytosterole zunächst durch die während der Statintherapie geringere Zahl der zirkulierenden Lipoproteine vermindert wurden. Diese Verminderung der Phytosterole wurde jedoch durch die allmähliche Anreicherung der Phytosterole in der Leber und damit auch in den Lipoproteinen ausgeglichen, die eine Folge der gehemmten biliären Sterolausscheidung unter Statintherapie war. Die Anreicherung der Phytosterole verlief je nach Stoffwechsellage bei einigen Studienteilnehmern wahrscheinlich schneller als bei anderen. Letztlich führt aber genau dieser Mechanismus möglicherweise zu dem häufig unter Langzeittherapie mit Statinen beobachteten signifikanten Anstieg der Phytosterole im Serum (128, 167, 168).

Die Verwendung der deuterierten und natürlichen Phytosterolkonzentrationen als Indikatoren für die Änderungen der Cholesterolresorption durch eine Statintherapie ist daher kritisch zu überprüfen im Hinblick auf die Dauer einer Statintherapie. Sie könnten sich mit Dauer der Statintherapie ändern, ohne dass sich tatsächlich die Cholesterolresorption ändert.

In früheren Studien wurde die Beobachtung gemacht, dass die Serumkonzentration der natürlichen Phytosterole Campesterol und Sitosterol mit der Effizienz der Cholesterolresorption (bestimmt nach der Methode von Crouse und Grundy) korrelieren, insbesondere wenn die Phytosterolkonzentrationen jeweils im Verhältnis zur Cholesterolkonzentration im Serum angegeben werden (96, 143). Dieses hat dazu geführt, dass die Phytosterol/Cholesterol-Quotienten als Indikatoren für die Wirkung von Medikamenten auf die Cholesterolresorption eingesetzt werden (106, 128, 174-177). In der vorliegenden Studie stiegen die Phytosterol/Cholesterol-Quotienten (Campesterol/Cholesterol, Sitosterol/Cholesterol, D₆-Campesterol/Cholesterol und D₆-Sitosterol/Cholesterol) unter Simvastatin jeweils im Mittel

um mindestens +30 % signifikant gegenüber Placebo an. Sie wurden auch unter Simvastatin plus Ezetimib signifikant gegenüber Ezetimib angehoben. Dies liegt jedoch daran, dass die Cholesterolkonzentration im Serum unter Simvastatin stark gesenkt wurde, die deuterierten und natürlichen Phytosterole sich jedoch nur sehr gering und größtenteils nicht signifikant änderten. In einigen Studien wurde der beobachtete Anstieg der Phytosterol/Cholesterol-Quotienten unter Statintherapie dahingehend interpretiert, dass die Cholesterolresorption unter Statintherapie ansteigt (128, 174, 175). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen jedoch, dass sich die Cholesterolresorption unter Simvastatin tatsächlich nicht signifikant gegenüber Placebo änderte. Ebenso führte die Kombinationsgabe von Simvastatin plus Ezetimib im Vergleich zur alleinigen Gabe von Ezetimib zu keiner Änderung der Cholesterolresorption. Damit sind die natürlichen Phytosterol/Cholesterol-Quotienten und auch die D₆-Phytosterol/Cholesterol-Quotienten nicht dazu geeignet, um Aussagen über die Änderung der Cholesterolresorption unter der Wirkung einer Statintherapie zu machen.

Durch die Standardisierung der D₆-Sterolkonzentrationen auf natürliches Cholesterol konnte der Einfluss des Lipoproteinmetabolismus auf die D₆-Cholesterolkonzentration eliminiert werden. Bei den deuterierten und natürlichen Phytosterolen wird jedoch bei einer Standardisierung auf Cholesterol nicht berücksichtigt, dass sich gleichzeitig die Zusammensetzung der Lipoproteine änderte. So korrelierten die natürlichen und deuterierten Phytosterole unter der Behandlung mit Simvastatin auch nicht mit der Serumkonzentration des natürlichen Cholesterols. Dies zeigt, dass eine Standardisierung von Serumkonzentrationen auf Cholesterol immer kritisch überprüft werden muss.

Auffallend war im Zusammenhang mit den absoluten Phytosterolkonzentrationen außerdem, dass sie durch Simvastatin in Kombination mit Ezetimib signifikant stärker gesenkt wurden als durch Ezetimib. Der Effekt von Simvastatin allein gegenüber Placebo war jedoch nicht signifikant (abgesehen von D₆-Campesterol). Diese synergistische Wirkung von Simvastatin plus Ezetimib auf die Phytosterole beruhte am ehesten darauf, dass durch die Sterolresorptionshemmung mit Ezetimib eine sehr viel geringere Menge an deuterierten Sterolen in die Leber gelangte. Die Anreicherung der deuterierten Sterole in der Leber, die vermutlich durch die Hemmung der biliären Sekretion durch Simvastatin ausgelöst wurde, lief unter Simvastatin plus Ezetimib wahrscheinlich langsamer ab als unter der Monotherapie mit Simvastatin. Demnach stieg der Gehalt der Phytosterole in den von der Leber vermindert freigesetzten Lipoproteinen unter Simvastatin plus Ezetimib wahrscheinlich auch nicht so stark wie unter der Monotherapie mit Simvastatin. Folge war, dass die Serumkonzentrationen der D₆-

Phytosterole und natürlichen Phytosterole bei allen Studienteilnehmern unter der Therapie mit Simvastatin plus Ezetimib signifikant gegenüber Ezetimib abfielen. Die deuterierten und natürlichen Phytosterole im Serum spiegelten damit zwar im Mittel wider, dass die Cholesterolresorption unter Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib gegenüber Placebo gesenkt wurde. Sie zeigten jedoch nicht an, dass sich die Cholesterolresorption unter Simvastatin plus Ezetimib gegenüber der Monotherapie mit Ezetimib nicht signifikant änderte (**Abbildung 5.4** und **Abbildung 5.8**).

Unter der kombinierten Gabe von Simvastatin plus Ezetimib lag die mittlere D₆-Cholesterolkonzentration 22 % niedriger als nach der alleinigen Gabe von Ezetimib. Dies entsprach der durch Simvastatin gegenüber Placebo ausgelösten Senkung der D₆-Cholesterolkonzentration (-23 %) und kann damit durch die verminderte Freisetzung von D₆-Cholesterol in Form von Lipoproteinen aus der Leber in die Zirkulation erklärt werden. Durch die Angabe der D₆-Cholesterolkonzentration im Verhältnis zur Serumkonzentration des natürlichen Cholesterols konnte dieser Einflussfaktor eliminiert werden. Der mittlere Quotient D₆-Cholesterol/Cholesterol war unter Simvastatin plus Ezetimib nicht signifikant niedriger als unter Ezetimib.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten damit darauf hin, dass sich vor allem die Bestimmung von oral verabreichtem deuteriertem Cholesterol im Serum dazu eignen kann, bei einer größeren Anzahl von Hypercholesterolämiepatienten die Änderungen der Cholesterolresorption durch eine lipidsenkende Therapie mit Simvastatin und/oder Ezetimib zu untersuchen. Durch die Bestimmung von D₆-Cholesterol/Cholesterol im Serum scheint es außerdem möglich zu sein, unbehandelte Hypercholesterolämiepatienten in Bezug auf eine hohe und sehr niedrige Cholesterolresorptionsrate zu screenen. Gleiches gilt für Hypercholesterolämiepatienten unter Simvastatin-Therapie. Wobei hier die absolute D₆-Cholesterolkonzentration aufgrund der engeren Korrelation mit der Cholesterolresorptionsrate zu bevorzugen ist.

6.2.4 Bestimmung der deuterierten Serumsterole als Indikatoren für die Cholesterolresorption im Vergleich zu bestehenden Methoden zur Cholesterolresorptionsbestimmung

Im Folgenden wird die Verwendung von oral verabreichten deuterierten Sterolen als Indikatoren für die Cholesterolresorption im Vergleich zu anderen Methoden zur Bestimmung der intestinalen Cholesterolresorption diskutiert. Es ist in den letzten Jahrzehnten eine Anzahl an Methoden zur Bestimmung der Cholesterolresorption beim Menschen entwickelt worden. Diese können eingeteilt werden in (a) Methoden, bei denen radioaktive Substanzen zum Einsatz kommen (131-138), (b) Methoden, bei denen mit stabilen Isotopen markierte Sterole verwendet werden (39, 141) und (c) Verfahren, bei denen die Konzentrationen von natürlichen Phytosterolen im Serum herangezogen werden (96, 143).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung der Cholesterolresorption nach Lütjohann *et al.* (39) ist eine von zwei etablierten Methoden, bei der stabile Isotope zur Bestimmung der Cholesterolresorptionsrate eingesetzt werden. Sie basiert auf dem Prinzip der *continuous feeding dual isotope method* von Crouse und Grundy (137). Im Gegensatz zu Crouse und Grundy verwenden Lütjohann *et al.* jedoch stabile Isotope anstatt radioaktiver Isotope zur Markierung des Cholesterols. Die Verwendung von stabilen Isotopen hat entscheidende Vorteile gegenüber radioaktiven Isotopen. Da Studienteilnehmer keiner zusätzlichen radioaktiven Strahlung ausgesetzt sind, ermöglichen Stabile-Isotopen-Markierungen, dass bei Probanden Mehrfachuntersuchungen sicher durchgeführt werden können. Dies ist von besonderer Relevanz bei Studien, in denen die Probanden ihre eigene Kontrolle darstellen. Durch die gesundheitliche Unbedenklichkeit von stabilen Isotopen, können mit ihnen auch Frauen in gebärfähigem Alter, Schwangere und Kinder in Studien untersucht werden. Im Gegensatz zur Arbeit mit radioaktiven Substanzen sind für stabile Isotope keine speziellen Labors und Vorsichtsmaßnahmen notwendig und ihr Einsatz ist in allen Ländern erlaubt (140, 178, 179). Die Methoden, bei denen radioaktive Substanzen zur Bestimmung der Cholesterolresorption eingesetzt werden, finden daher heute auch aufgrund ethischer Bedenken kaum mehr Anwendung (14).

Vor der Entwicklung der Cholesterolresorptionsmethode nach Lütjohann im Jahr 1993 gab es nur Varianten der intestinalen Perfusionsmethode, bei denen keine radioaktiven Substanzen verwendet wurden (38, 138). Bei der intestinalen Perfusionsmethode wird dem Probanden über einen Schlauch eine flüssige Lösung mit Cholesterol und Sitosterol ins Duodenum in-

fundiert. In weiter distal liegenden Darmabschnitten wird über zwei weitere Schläuche der Darminhalt dann konstant abgesaugt. Solange kein isotopenmarkiertes Cholesterol verwendet wird, bestimmen diese Methoden hauptsächlich die Resorption von biliärem Cholesterol.

Bosner und Ostlund *et al.* (141) entwickelten im selben Jahr wie Lütjohann *et al.* eine Cholesterolresorptionsmethode mit stabilen Isotopen basierend auf der Methode von Zilversmit (132, 134, 135). Der Ansatz dieser sogenannten *plasma dual stable isotope method* beruht darauf, dass mit stabilen Isotopen markiertes [²H]-Cholesterol oral verabreicht wird und gleichzeitig [¹³C]-Cholesterol als zweiter Marker intravenös appliziert wird. Auf diese Weise können die Clearance, die Kompartimentierung und der Metabolismus des oral verabreichten, markierten Cholesterols berücksichtigt werden. Nach ein bis zwei Tagen wird das Verhältnis der Anreicherung beider Marker im Plasma bestimmt. Für den intravenösen Marker wird dabei per Definition eine Resorption von 100 % angenommen.

Die Bosner/Ostlund-Methode (141) hat gegenüber der Methode von Lütjohann *et al.* (39) den Vorteil, dass ein aufwendiges Sammeln und die Analyse von Stuhlproben entfallen. Die notwendige intravenöse Injektion des markierten Cholesterols ist jedoch ein invasiver Schritt, durch den zusätzliche ethische Aspekte berücksichtigt werden müssen und der besondere Vorsichtsmaßnahmen bei der Herstellung der Markersubstanzen fordert – alles Schritte, die letztlich die Studienkosten erhöhen. Der entscheidende Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Marker nur zu einem Zeitpunkt appliziert werden. Die Bestimmung der Cholesterolresorption nach der Bosner/Ostlund-Methode (141) wird damit stärker durch die täglichen Resorptionsschwankungen beeinflusst. Bei der Lütjohann-Methode (39) wird deuteriertes Cholesterol kontinuierlich verabreicht und mehrere Proben in Folge untersucht, wodurch über einen längeren Zeitraum eine durchschnittliche Resorption bestimmt werden kann, die nicht so sehr von den Tagesschwankungen beeinflusst ist. Neben D₆-Cholesterol wird dabei auch deuteriertes D₄-Sitostanol als „nicht-resorbierbarer“ *fecal flow marker* verabreicht. Isotopenmarkiertes Sitostanol wird im Darm nicht metabolisiert. Seine Verwendung als valider *fecal flow marker* wurde in Studien bestätigt (39, 46, 180), auch wenn davon auszugehen ist, dass D₄-Sitostanol in sehr geringen Mengen resorbiert wird (144). Ein *fecal flow marker* fungiert damit als eine Art interner Standard und bringt den Vorteil mit sich, dass nur ein Aliquot der pro Tag ausgeschiedenen Stuhlmenge gesammelt und analysiert werden muss. Der Aufwand des Probensammelns wird somit deutlich verringert. Die Ausführungen machen aber auch deutlich, dass diese bisherigen Methoden zur Bestimmung der prozentualen oder absoluten resorbierten Cholesterolmenge dennoch insgesamt recht aufwendige Verfahren darstellen, die für Anwendungen in Studien mit größerer Probandenzahl ungeeignet sind.

Bisher war die Bestimmung des Verhältnisses von pflanzlichen Sterolen zu Cholesterol im Serum die einzige praktikable Methode, um bei größeren Interventionsstudien Informationen über die Änderung der Cholesterolresorption zu gewinnen (14). Dieser Ansatz basiert auf den Beobachtungen, dass bei Personen ohne Resorptionsstörungen die Serumkonzentration der Phytosterole Campesterol und Sitosterol mit der Effizienz der Cholesterolresorption (bestimmt nach der Methode von Crouse und Grundy) korrelieren, insbesondere wenn die Phytosterolkonzentrationen jeweils im Verhältnis zur Cholesterolkonzentration im Serum angegeben werden (96, 143). Der Korrelationskoeffizient für den Zusammenhang zwischen den Phytosterolen im Serum und der Cholesterolresorptionsrate lag bei der Studie von Miettinen *et al.* (143) bei $r = 0,423$ ($P < 0,001$) für den Campesterol/Cholesterol-Quotienten und $r = 0,301$ ($P < 0,05$) für den Sitosterol/Cholesterol-Quotienten im Serum von 63 Männern. In der vorliegenden Studie korrelierten die Quotienten Campesterol/Cholesterol und Sitosterol/Cholesterol im Serum mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,541$ bzw. $0,513$ ($P < 0,01$) mit der Cholesterolresorptionsrate (**Tabelle 5.8**). Die Ergebnisse bestätigen damit die Beobachtungen von Miettinen *et al.* (143).

Der Nachteil bei der Bestimmung natürlicher Phytosterole im Serum ist jedoch, dass ihre Konzentrationen im Gegensatz zu den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterolen, durch schwankende Phytosterolgehalte in der Nahrung der Studienteilnehmer beeinflusst werden können. Theoretisch können auch Phytosterole, die aus dem Gewebe ins Blut freigesetzt werden, zu einem Anstieg der Phytosterole im Serum führen. Auch wenn die Auswertung der Ernährungsprotokolle ergab, dass die Studienteilnehmer alle eine vergleichbare Menge an Cholesterol mit der Nahrung aufnahmen, ist es durchaus möglich, dass die Studienteilnehmer unterschiedliche Mengen an Phytosterolen zu sich nahmen, da eine Auswertung der Ernährungsprotokolle bezüglich der Phytosterolzufuhr nicht möglich war. Wie stark die Phytosterolkonzentrationen im Serum jedoch tatsächlich von der mit der Nahrung aufgenommenen Menge der Phytosterole beeinflusst werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Allgemein erhöht eine sehr hohe orale Dosis von 2 bis 3 g Phytosterole täglich die Sitosterol- und Campesterolkonzentration im Serum um 30 % bzw. 70 % bei gesunden Probanden (181, 182). In einer kontrollierten Studie wurde kürzlich gezeigt, dass die Interventionsgruppe, bei der die tierischen Lebensmittel in der Nahrung durch pflanzliche (und damit phytosterolreiche) Lebensmittel ersetzt wurden, eine um 20 % höhere Sitosterolkonzentration aufwies als die Kontrollgruppe. Die Campesterol- und die Gesamtphytosterolkonzentrationen im Serum waren jedoch nicht signifikant verschieden (183). Da in der vorliegenden Studie die Einnahme von Phytosterolsupplementen verboten war und die Probanden ihre Ernährungsgewohnheiten bei-

behalten sollten, ist davon auszugehen, dass die Phytosterole aus der Nahrung die Phytosterolkonzentrationen im Serum, wenn dann nur geringfügig beeinflussten. Außerdem bestand zwischen den Serumkonzentrationen von D₆-Sitosterol und Sitosterol sowie D₆-Campesterol und Campesterol, wie bereits darauf hingewiesen, in jeder Behandlungsphase eine signifikante Korrelation und über die Behandlungsphasen hinweg ein konstantes Verhältnis. Dies kann als weiterer Hinweis gewertet werden, dass die natürlichen Phytosterolkonzentrationen im Serum der Studienteilnehmer nicht in besonders starkem Ausmaß durch schwankende Phytosterolgehalte in der Nahrung beeinflusst wurden.

Die deuterierten Sterole haben den Vorteil, dass sie in Form der Kapsel in genau bekannten Mengen eingenommen werden. Durch die Markierung sind sie von endogenen Sterolen aus anderen Quellen zu unterscheiden, die die Serumkonzentrationen erhöhen können und damit zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse beitragen könnten. Tatsächlich waren die deuterierten Serumsterole in der vorliegenden Studie unter Placebo sehr viel enger mit der Cholesterolresorption assoziiert als die natürlichen Phytosterole. Im Gegensatz zu den Phytosterol/Cholesterol-Quotienten reflektierten insbesondere die mittleren Änderungen der cholesterolstandardisierten D₆-Cholesterolkonzentrationen die Änderungen der Cholesterolresorption in den Behandlungsphasen mit Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib. Mit der Bestimmung der oral verabreichten deuterierten Sterole im Serum kann jedoch nicht die relative oder absolute Menge an resorbiertem Cholesterol erfasst werden. Dazu sollte weiterhin die *continuous feeding dual stable isotope method* herangezogen werden. In diesem Zusammenhang eignet sich die Bestimmung von oral verabreichtem D₆-Cholesterol im Serum dennoch sehr gut als ergänzende Methode. Auf diese Weise kann ein umfassenderes Bild der Wirkung zum Beispiel eines Medikamentes auf den Sterolmetabolismus bekommen werden. Wichtig für zuverlässige Ergebnisse bei der oralen Gabe von D₆-Cholesterol ist eine Auswaschphase zwischen den Applikationsphasen, insbesondere wenn ein Studiendesign vorliegt, in dem die Probanden ihre eigene Kontrolle darstellen. Da die Sterolhomöostase im Serum außerdem nicht allein von der Resorption bestimmt wird, muss bei der Interpretation der Ergebnisse immer berücksichtigt werden, dass auch andere Faktoren neben der Cholesterolresorption eine Veränderung der deuterierten Sterole im Serum bewirken können. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen jedoch, dass die Bestimmung von oral verabreichtem D₆-Cholesterol im Verhältnis zu Cholesterol mittels GC/MS ein vielversprechender Ansatz darstellt, mit dem auf recht einfache Weise bei einer größeren Anzahl von Probanden Änderungen der Cholesterolresorption bestimmt und Informationen über die Regulation der Cholesterolhomöostase gewonnen werden können. Der entscheidende Vorteil ist, dass für die Bestimmung von oral ver-

abreichem deuteriertem Cholesterol nur ein Einsatz von 20 µl Serum notwendig ist und auf ein aufwendiges Sammeln von Stuhlproben verzichtet werden kann.

6.2.5 Zusammenhang zwischen der Phytosterolresorption und den Serumsterolen

Unter der Behandlung mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib waren die deuterierten und natürlichen Phytosterole im Serum der Studienteilnehmer signifikant vermindert. Es ist daher anzunehmen, dass Ezetimib auch die Resorption der Phytosterole hemmt. Dies wurde bisher jedoch noch nicht durch eine direkte Bestimmung der Phytosterolresorption im Rahmen einer klinischen Studie bewiesen. Im Rahmen der vorliegenden klinischen Studie zur Wirkung von Simvastatin und/oder Ezetimib auf die Cholesterolresorption sollte daher ursprünglich auch explorativ die Resorption der Phytosterole Campesterol und Sitosterol nach der Methode von Lütjohann *et al.* (39) in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universität Bonn untersucht werden. Dies hätte auch ermöglicht, in der vorliegenden Arbeit den Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen der deuterierten Sterole und den Resorptionsraten für die pflanzlichen Sterole zu untersuchen. Das mit der Kapsel oral verabreichte D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol war jedoch am A-Ring des Sterolgerüsts mit stabilen Isotopen markiert (2,2,3,4,4,6-²H₆-Campesterol und 2,2,3,4,4,6-²H₆-Sitosterol), im Gegensatz zu D₆-Cholesterol, das die Markierungen an seiner Seitenkette trug (26,26,26,27,27,27-²H₆-Cholesterol). Es stellte sich heraus, dass die Deuterien im Ring der Moleküle, während der bakteriellen Metabolisierung im Darm eliminiert werden (184). Dadurch konnten die Metabolisierungsprodukte der deuterierten Phytosterole nicht analysiert und folglich auch die Phytosterolresorptionen nicht zuverlässig bestimmt werden.

Literaturangaben zufolge ist die intestinale Resorption von Cholesterol jedoch im Schnitt rund 3 mal höher als die von Campesterol und die Sitosterolresorption rund 3 mal niedriger als die Campesterolresorption, unabhängig davon, ob die Resorptionsraten mittels der intestinalen Perfusionsmethode oder mit der *continuous feeding dual isotope method* bestimmt werden (37, 47). Diese Effizienz der Resorptionsraten (Cholesterol > Campesterol > Sitosterol) wurde durch die Konzentrationen der drei deuterierten Sterole im Serum der Studienteilnehmer (D₆-Cholesterol > D₆-Campesterol > D₆-Sitosterol) in allen vier Behandlungsphasen qualitativ widerspiegelt. Der quantitative Unterschied zwischen Serumkonzentrationen der drei Sterole war jedoch größer als der in der Literatur beschriebene Faktor 3 zwischen den entsprechenden Resorptionsraten. So war die mittlere D₆-Cholesterolkonzentration unter Placebo rund ein Faktor 7 höher als die D₆-Campesterolkonzentration. Die D₆-Campesterolkonzentration lag

etwa um Faktor 4 höher als die D₆-Sitosterolkonzentration (**Tabelle 5.6**). Zu den größeren Konzentrationsunterschieden hat möglicherweise beigetragen, dass die im Nachhinein durchgeführte Korrektur der Konzentrationen um die entsprechend zugeführten Dosen in der Kapsel nicht exakt zu den Konzentrationsverhältnissen führt, die erreicht worden wären, wenn alle drei deuterierten Sterole in genau denselben Mengen verabreicht worden wären. Des Weiteren muss auch berücksichtigt werden, dass die Anreicherung der deuterierten Sterole im Blut nach der oralen Gabe nicht nur von der Resorptionseffizienz, sondern auch durch die biliäre Ausscheidung der Sterole beeinflusst wird. So zeigten Sudhop *et al.* in einer Studie mit fünf männlichen, gesunden Freiwilligen (52), dass sich die „hepatische Clearance“ der drei Sterole deutlich unterscheidet und in inverser Beziehung zu den Sterolresorptionsraten steht: Die höchste „hepatische Clearance“ wurde für Sitosterol ermittelt (4,97 dl/h), gefolgt von Campesterol (2,11 dl/h) und Cholesterol (0,31 dl/h). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien von Salen *et al.* und Bhattacharyya *et al.* (26, 48, 185), die für Sitosterol eine kürzere Halbwertszeit als für Cholesterol nachweisen konnten, nachdem sie die beiden Sterole als radioaktive Marker intravenös appliziert hatten. Da Campesterol von seiner Struktur dem Cholesterol ähnlicher ist als Sitosterol, ist davon auszugehen, dass seine Halbwertszeit zwischen Cholesterol und Sitosterol liegt.

Ostlund *et al.* verwendeten ihre Methode zur Bestimmung der Cholesterolresorption (*plasma dual stable isotope method* nach Bosner/Ostlund (141)) auch, um die Resorption der Phytosterole Campesterol und Sitosterol und der Phytostanole Campestanol und Sitostanol zu bestimmen (186). Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass die resorbierten deuterierten Phytosterole einem First-Pass-Effekt in der Leber unterliegen (66). So wird mit der Methode letztlich die Bioverfügbarkeit jedoch nicht die Resorption der Phytosterole bestimmt. Dieses erklärt auch, warum die Phytosterol- und Phytostanolresorptionsraten in dieser Studie von Ostlund *et al.* (186) vergleichsweise niedrig waren (0,04 % für Sitostanol bis 1,89 % für Campesterol).

Bei den Hypercholesterolämiepatienten der vorliegenden Studie korrelierten die Serumkonzentrationen von D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol in allen Behandlungsphasen signifikant miteinander (**Abbildung 5.11**). Die Steigungen der zugehörigen Regressionsgeraden waren dabei in den Behandlungsphasen Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib jeweils nicht signifikant verschieden von der Steigung der Regressionsgeraden unter Placebo. Dies lässt vermuten, dass auch die Resorptionsraten von Campesterol und Sitosterol miteinander korrelierten und beide Resorptionsraten jeweils in ähnlichem Ausmaß durch die Medikamente verändert wurden.

Zwischen D₆-Cholesterol und dem Phytosterol D₆-Campesterol bzw. D₆-Sitosterol war auch eine signifikante Korrelation im Serum zu sehen. Die Steigungen der Regressionsgeraden unter den Behandlungsphasen mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib unterschieden sich jedoch signifikant von der Steigung der Regressionsgeraden unter Placebo. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die deuterierten Phytosterole unter der Behandlung mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib im Serum der Studienteilnehmer stärker vermindert wurden als D₆-Cholesterol. Die Ergebnisse könnten damit als Hinweis gewertet werden, dass Ezetimib eine selektive Wirkung auf die Sterole ausübt und die Resorption der Phytosterole stärker hemmt als die Cholesterolresorption.

Über den zugrunde liegenden Mechanismus kann in diesem Zusammenhang nur spekuliert werden. Den Mäusexperimenten von Igel *et al.* nach zu urteilen, ist die Aufnahme der Sterole in den Enterozyten ein schneller, nicht-selektiver Prozess, der bereits nach wenigen Minuten beginnt. Die pflanzlichen Sterole scheinen dann sehr schnell wieder über ABCG5/G8 aus dem Enterozyten ausgeschieden zu werden (66). Die Ergebnisse einer früheren Studie zeigen, dass die Unterschiede zwischen den Resorptionsraten von Cholesterol, Campesterol und Sitosterol bei normocholesterolämischen Personen und Patienten mit Phytosterolämie, deren ABCG5/ABCG8-Transporter defekt sind, nahezu identisch sind (46). Interessanterweise bleibt auch bei ABCG5/ABCG8-Knockout-Mäusen die Reihenfolge bezüglich der Resorptionseffizienz bestehen (Cholesterol > Campesterol > Sitosterol) (73). Dies lässt vermuten, dass von ABCG5/ABCG8 unabhängige Faktoren dazu beitragen, dass eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Sterolen bezüglich ihrer intestinalen Resorption und somit auch ihrer biliären Ausscheidung stattfindet. Da Ezetimib keine direkte Wirkung auf die Funktionsweise der ABCG5/G8-Transporter hat (187, 188), ist es durchaus möglich, dass Ezetimib genau an diesen bisher noch unbekanntenen Faktoren angreift und dadurch eine selektive Wirkung auf die Resorption einzelner Sterole entfaltet.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass auch die Serumkonzentrationen von oral verabreichten deuterierten Phytosterolen als Indikatoren für ihre intestinale Resorption bestimmt werden können. Dies kann jedoch nur verifiziert werden, wenn auch die Resorptionsraten der Phytosterole bei Studienteilnehmern quantifiziert werden und mit den Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Phytosterole verglichen werden.

6.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit gelang es, eine gaschromatographisch/massenspektrometrische Methode zu etablieren, mit der, bei einem Einsatz von 20 µl Serum, oral verabreichtes D₆-Cholesterol bis zu einer Konzentration von 21 µg/dl simultan mit natürlichem Cholesterol im Serum von Hypercholesterolämiepatienten quantifiziert werden kann. Durch eine Abtrennung der Phytosterole vom Cholesterol mittels HPLC und nachfolgender Anreicherung war es auch möglich, Spuren von oral verabreichten deuterierten Phytosterolen im Serum mittels GC/MS zu bestimmen. D₆-Campesterol konnte bis zu einer Bestimmungsgrenze von 93 ng/dl und D₆-Sitosterol bis 112 ng/dl gleichzeitig mit den natürlichen Sterolen Campesterol und Sitosterol im Serum von Hypercholesterolämiepatienten gemessen werden.

Die Validierung ergab, dass die Methoden zuverlässige Ergebnisse mit hoher Präzision und Richtigkeit liefern. Sie konnten somit im Rahmen einer klinischen Studie zur Wirkung von Simvastatin und/oder Ezetimib auf die Sterolresorption angewendet werden. Die Anwendung der Methoden bestätigte, dass das Nachweisvermögen der Analyseverfahren ausreichend hoch war, um die oral verabreichten deuterierten Sterole unter allen vier Behandlungen (Placebo, Simvastatin, Ezetimib, Simvastatin plus Ezetimib) in den Serumproben der Studienteilnehmer zu quantifizieren.

Aus den Ergebnissen der klinischen Studie mit männlichen Hypercholesterolämiepatienten, ließen sich bezüglich der eingangs gestellten Fragestellung folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die Serumkonzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol korrelieren signifikant mit den Serumkonzentrationen der entsprechenden natürlichen Sterole Cholesterol, Campesterol und Sitosterol. Die mittleren Quotienten D₆-Campesterol/Campesterol und D₆-Sitosterol/Sitosterol im Serum ändern sich im Gegensatz zum Quotienten D₆-Cholesterol/Cholesterol unter einer Behandlung mit Simvastatin, Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib nicht signifikant gegenüber Placebo.
- Die absoluten und insbesondere cholesterol-standardisierten Serumkonzentrationen von oral verabreichtem D₆-Cholesterol, D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol korrelieren in der Behandlungsphase mit Placebo signifikant positiv mit der Cholesterolresorptionsrate und signifikant negativ mit der Cholesterolsyntheserate. Die Serumkonzent-

rationen der Phytosterole Campesterol und Sitosterol (absolut und cholesterolstandardisiert), die bereits als Indikator für die Cholesterolresorption in klinischen Studien verwendet werden, korrelieren ebenso signifikant positiv mit der Cholesterolresorption und signifikant negativ mit der Cholesterolsynthese, der Zusammenhang ist jedoch schwächer als für die deuterierten Sterole.

- Die mittleren prozentualen Änderungen der Serumkonzentration von D₆-Cholesterol (ausgedrückt im Verhältnis zur Cholesterolkonzentration) in den Behandlungsphasen mit Simvastatin (+7,5 %), Ezetimib (-52 %) und Simvastatin plus Ezetimib (-47 %) gegenüber Placebo kommen den Änderungen der Cholesterolresorption in den Behandlungsphasen (Simvastatin: +7 %, Ezetimib: -57 %, Simvastatin plus Ezetimib: -52 %) am nächsten. Die individuellen prozentualen Änderungen der cholesterolstandardisierten D₆-Cholesterolkonzentration und der Cholesterolresorption durch eine Behandlung korrelieren nicht miteinander. Der signifikant positive Zusammenhang zwischen der cholesterolstandardisierten D₆-Cholesterolkonzentration im Serum und der Cholesterolresorption unter Simvastatin ist der gleiche wie unter Placebo. Unter der Behandlung mit Ezetimib und Simvastatin plus Ezetimib ist die cholesterolstandardisierte D₆-Cholesterolkonzentration im Serum nicht signifikant mit der Cholesterolresorption assoziiert.
- Die Konzentrationsverhältnisse der drei oral verabreichten, deuterierten Sterole D₆-Cholesterol, D₆-Sitosterol, D₆-Campesterol im Serum spiegeln in allen Behandlungsphasen wider, dass Literaturangaben zufolge die Resorptionsrate von Cholesterol über Campesterol nach Sitosterol abnimmt. D₆-Campesterol und D₆-Sitosterol im Serum korrelieren unabhängig von der Behandlung signifikant miteinander und der Zusammenhang ist in allen Behandlungsphasen derselbe. Zwischen D₆-Cholesterol und den D₆-Phytosterolen war die Korrelation jeweils schwächer und der Zusammenhang war nicht in allen vier Behandlungsphasen mit derselben Regressionsgerade zu beschreiben.

Die Ergebnisse deuten damit darauf hin, dass insbesondere die einwöchige orale Gabe von D₆-Cholesterol (3 × 3 mg/d) und die nachfolgende Bestimmung von D₆-Cholesterol im Verhältnis zu Cholesterol im Serum mittels GC/MS anstatt der Methode nach Lütjohann *et al.* eingesetzt werden kann, um Änderungen der Cholesterolresorption durch lipidsenkende Medikamente zu untersuchen. Der entscheidende Vorteil dabei ist, dass bei diesem Verfahren auf

das Sammeln von Stuhlproben verzichtet werden kann und für die GC/MS-Analyse der Sterole nur 20 µl Serum notwendig sind. Die Aufarbeitung der Serumproben ist im Vergleich zu den Stuhlproben einfacher und für das Laborpersonal deutlich angenehmer.

Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die absoluten und cholesterol-standardisierten Konzentrationen der oral verabreichten deuterierten Sterole im Serum als Indikatoren verwendet werden können, um in einer Gruppe von Hypercholesterolämiepatienten ohne Therapie oder unter Statintherapie Patienten mit hoher und niedriger Cholesterolresorption zu identifizieren. Die deuterierten Sterole scheinen dazu aufgrund ihrer höheren indikativen Stärke besser geeignet zu sein als die natürlichen Phytosterole (ausgedrückt im Verhältnis zu Cholesterol), die bereits als Indikatoren für die Cholesterolresorption in klinischen Studien verwendet werden. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob sich die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse auch bei anderen Probandenkollektiven und unterschiedlichen Interventionen bestätigen und ob zwischen den Resorptionsraten der Phytosterole und den oral verabreichten deuterierten Serumsterolen ein ähnlicher Zusammenhang zu finden ist.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mackay, J., and Mensah, G. 2004. *Atlas of Heart Disease and Stroke*: WHO World Health Organization.
2. Downs, J.R., Clearfield, M., Weis, S., Whitney, E., Shapiro, D.R., Beere, P.A., Langendorfer, A., Stein, E.A., Kruyer, W., and Gotto, A.M., Jr. 1998. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *Jama* 279:1615-1622.
3. Heart Protection Study Collaborative, G. 2002. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomised placebocontrolled trial. *The Lancet* 360:7-22.
4. 1994. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383-1389.
5. Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., et al. 1996. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335:1001-1009.
6. Baigent, C., Keech, A., Kearney, P.M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R., et al. 2005. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366:1267-1278.
7. 1998. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 339:1349-1357.
8. 2001. Clinical reality of coronary prevention guidelines: a comparison of EUROASPIRE I and II in nine countries. EUROASPIRE I and II Group. European Action on Secondary Prevention by Intervention to Reduce Events. *Lancet* 357:995-1001.
9. 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.
10. Shepherd, J. 2003. Combined lipid lowering drug therapy for the effective treatment of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 24:685-689.
11. Pearson, T., Denke, M., McBride, P., Battisti, W.P., Brady, W.E., and Palmisano, J. 2005. Effectiveness of the addition of ezetimibe to ongoing statin therapy in modifying lipid profiles and attaining low-density lipoprotein cholesterol goals in older and elderly patients: subanalyses of data from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Geriatr Pharmacother* 3:218-228.
12. Sudhop, T., Lütjohann, D., Kodal, A., Igel, M., Tribble, D.L., Shah, S., Perevozskaya, I., and von Bergmann, K. 2002. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by

- ezetimibe in humans. *Circulation* 106:1943-1948.
13. Salen, G., von Bergmann, K., Lütjohann, D., Kwiterovich, P., Kane, J., Patel, S.B., Musliner, T., Stein, P., and Musser, B. 2004. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation* 109:966-971.
 14. Matthan, N.R., and Lichtenstein, A.H. 2004. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 174:197-205.
 15. Stellaard, F., and Kuipers, F. 2005. Assessment of modes of action and efficacy of plasma cholesterol-lowering drugs: measurement of cholesterol absorption, cholesterol synthesis and bile acid synthesis and turnover using novel stable isotope techniques. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5:209-218.
 16. Jones, P.J., Ausman, L.M., Croll, D.H., Feng, J.Y., Schaefer, E.A., and Lichtenstein, A.H. 1998. Validation of deuterium incorporation against sterol balance for measurement of human cholesterol biosynthesis. *J Lipid Res* 39:1111-1117.
 17. Koolmann, J., and Röhm, K.-H. 1998. *Taschenatlas der Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
 18. Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Caballero, B., and Cousins, R.J. 2006. *Modern nutrition in health and disease*. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
 19. Bloch, K.E. 1983. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* 14:47-92.
 20. Simons, K., and Ikonen, E. 2000. How cells handle cholesterol. *Science* 290:1721-1726.
 21. Barenholz, Y. 2002. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to rafts. *Progress in Lipid Research* 41:1-5.
 22. Pizzo, P., and Viola, A. 2003. Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol* 15:255-260.
 23. Lafont, F., and van der Goot, F.G. 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* 7:613-620.
 24. Wolf, G. 1999. The function of cholesterol in embryogenesis. *J Nutr Biochem* 10:188-192.
 25. Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. 1996. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science* 274:255-259.
 26. Salen, G., Ahrens, E.H., Jr., and Grundy, S.M. 1970. Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest* 49:952-967.
 27. Jones, P.J., MacDougall, D.E., Ntanios, F., and Vanstone, C.A. 1997. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 75:217-227.
 28. Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., and Lampi, A.M. 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 80:939-966.
 29. Pollak, O.J. 1953. Successive prevention of experimental hypercholesteremia and cholesterol atherosclerosis in the rabbit. *Circulation* 7:696-701.
 30. Pollak, O.J. 1953. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 7:702-706.

31. Peterson, D.W. 1951. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* 78:143-147.
32. Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., and Paoletti, R. 2003. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 78:965-978.
33. Krichewsky, D., and Tepper, S.A. 1961. The free and ester sterol content of various food stuffs. *J Nutr* 74:441-444.
34. Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2004. *Ernährungsbericht 2004*. Bonn: Plump Druckerei.
35. Weihrauch, J.L., and Gardner, J.M. 1978. Sterol content of foods of plant origin. *J Am Diet Assoc* 73:39-47.
36. Wolfram, G. 2001. Diagnostik und Therapie der Dyslipoproteinämien: Ernährungstherapie. In *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. P. Schwandt, W.O. Richter, and K.G. Parhofer, editors. Stuttgart: Schattauer. 374-427.
37. von Bergmann, K., Sudhop, T., and Lütjohann, D. 2005. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol* 96:10D-14D.
38. Mok, H.Y., von Bergmann, K., and Grundy, S.M. 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.
39. Lütjohann, D., Meese, C.O., Crouse, J.R., 3rd, and von Bergmann, K. 1993. Evaluation of deuterated cholesterol and deuterated sitostanol for measurement of cholesterol absorption in humans. *J Lipid Res* 34:1039-1046.
40. Sudhop, T., Lütjohann, D., and von Bergmann, K. 2005. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Ther* 105:333-341.
41. Dietschy, J.M., and Weis, H.I. 1971. Cholesterol synthesis by the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 24:70-76.
42. Kostner, G.M., and März, W. 2001. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In *Handbuch der Stoffwechselstörungen*. P. Schwandt, W.O. Richter, and K.G. Parhofer, editors. Stuttgart: Schattauer.
43. Jones, P.J.H., and Kubow, S. 2006. Lipids, sterols, and their metabolites. In *Modern nutrition in health and disease*. M.E. Shils, M. Shike, A.C. Ross, B. Caballero, and R.J. Cousins, editors. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 92-122.
44. Rehner, G., and Daniel, H. 2002. *Biochemie der Ernährung*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
45. Lütjohann, D., Björkhem, I., and Ose, L. 1996. Phytosterolaemia in a Norwegian family: diagnosis and characterization of the first Scandinavian case. *Scand J Clin Lab Invest* 56:229-240.
46. Lütjohann, D., Björkhem, I., Beil, U.F., and 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.
47. Heinemann, T., Axtmann, G., and von Bergmann, K. 1993. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 23:827-831.

48. Salen, G., Shefer, S., Nguyen, L., Ness, G.C., Tint, G.S., and Shore, V. 1992. Sitosterolemia. *J Lipid Res* 33:945-955.
49. Boberg, K., Einarsson, K., and Björkhem, I. 1990. Apparent lack of conversion of sitosterol into C24-bile acids in humans. *J. Lipid Res.* 31:1083-1088.
50. Chan, Y.M., Varady, K.A., Lin, Y., Trautwein, E., Mensink, R.P., Plat, J., and Jones, P.J. 2006. Plasma concentrations of plant sterols: physiology and relationship with coronary heart disease. *Nutr Rev* 64:385-402.
51. Watzl, B., and Rechkammer, G. 2001. Phytosterine. *Ernährungs-Umschau* 48:161-164.
52. Sudhop, T., Sahin, Y., Lindenthal, B., Hahn, C., Luers, C., Berthold, H.K., and von Bergmann, K. 2002. 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.
53. Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. 2000. Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters. *Science* 290:1771-1775.
54. Clader, J.W. 2004. The discovery of ezetimibe: a view from outside the receptor. *J Med Chem* 47:1-9.
55. Wilson, M.D., and Rudel, L.L. 1994. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res* 35:943-955.
56. Hui, D.Y., and Howles, P.N. 2002. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 43:2017-2030.
57. Lammert, F., and Wang, D.Q. 2005. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology* 129:718-734.
58. Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., et al. 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303:1201-1204.
59. Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Liu, J., Yao, X., Iyer, S.P., Lam, M.H., Lund, E.G., et al. 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.
60. Davis, H.R., Jr, Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Zhu, L.-j., Graziano, M.P., and Altmann, S.W. 2007. Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 Prevents Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
61. Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J.M., Ma, Y., Du, W., Davis, M.A., Michaely, P., Liu, P., Willingham, M.C., and Rudel, L.L. 2006. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem* 281:6616-6624.
62. Yamanashi, Y., Takada, T., and Suzuki, H. 2007. Niemann-Pick C1-Like 1 Overexpression Facilitates Ezetimibe-Sensitive Cholesterol and beta-Sitosterol Uptake in CaCo-2 Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 320:559-564.
63. Kramer, W., Girbig, F., Corsiero, D., Pfenninger, A., Frick, W., Jahne, G., Rhein, M.,

- Wendler, W., Lottspeich, F., Hochleitner, E.O., et al. 2005. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem* 280:1306-1320.
64. Smart, E.J., De Rose, R.A., and Farber, S.A. 2004. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3450-3455.
65. Allayee, H., Laffitte, B.A., and Lusis, A.J. 2000. Biochemistry. An absorbing study of cholesterol. *Science* 290:1709-1711.
66. Igel, M., Giesa, U., Lütjohann, D., and von Bergmann, K. 2003. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* 44:533-538.
67. Edwards, P.A., Kennedy, M.A., and Mak, P.A. 2002. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol* 38:249-256.
68. Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. 2002. Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* 277:18793-18800.
69. Graf, G.A., Li, W.P., Gerard, R.D., Gelissen, I., White, A., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. 2002. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 110:659-669.
70. Graf, G.A., Yu, L., Li, W.P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. 2003. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 278:48275-48282.
71. Klett, E.L., Lee, M.H., Adams, D.B., Chavin, K.D., and Patel, S.B. 2004. Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol* 4:21.
72. Wang, J., Sun, F., Zhang, D.W., Ma, Y., Xu, F., Belani, J.D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., and Xie, X.S. 2006. Sterol transfer by ABCG5 and ABCG8: in vitro assay and reconstitution. *J Biol Chem* 281:27894-27904.
73. Yu, L., Hammer, R.E., Li-Hawkins, J., Von Bergmann, K., Lütjohann, D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. 2002. 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.
74. Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R.E., Berge, K.E., Horton, J.D., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. 2002. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 110:671-680.
75. Klett, E.L., Lu, K., Kosters, A., Vink, E., Lee, M.H., Altenburg, M., Shefer, S., Batta, A.K., Yu, H., Chen, J., et al. 2004. A mouse model of sitosterolemia: absence of *Abcg8/sterolin-2* results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med* 2:5.
76. Yu, L., Gupta, S., Xu, F., Liverman, A.D., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Repa, J.J., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. 2005. Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem* 280:8742-8747.
77. Yu, L., von Bergmann, K., Lütjohann, D., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. 2004. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res* 45:301-307.

78. Miettinen, T.A., Klett, E.L., Gylling, H., Isoniemi, H., and Patel, S.B. 2006. Liver transplantation in a patient with sitosterolemia and cirrhosis. *Gastroenterology* 130:542-547.
79. Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Al-likmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., et al. 2001. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 27:79-83.
80. Heimerl, S., Langmann, T., Moehle, C., Mauerer, R., Dean, M., Beil, F.U., von Bergmann, K., and Schmitz, G. 2002. Mutations in the human ATP-binding cassette transporters ABCG5 and ABCG8 in sitosterolemia. *Hum Mutat* 20:151.
81. Hubacek, J.A., Berge, K.E., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. 2001. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat* 18:359-360.
82. Lu, K., Lee, M.H., Hazard, S., Brooks-Wilson, A., Hidaka, H., Kojima, H., Ose, L., Stalenhoef, A.F., Miettinen, T., Björkhem, I., et al. 2001. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* 69:278-290.
83. Lütjohann, D., and von Bergmann, K. 1997. Phytosterolaemia: diagnosis, characterization and therapeutical approaches. *Ann Med* 29:181-184.
84. Buhman, K.K., Accad, M., Novak, S., Choi, R.S., Wong, J.S., Hamilton, R.L., Turley, S., and Farese, R.V., Jr. 2000. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 6:1341-1347.
85. Rudel, L.L., Lee, R.G., and Parini, P. 2005. ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1112-1118.
86. Field, F.J., and Mathur, S.N. 1983. beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J Lipid Res* 24:409-417.
87. Wang, D.Q.-H. 2007. Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Annual Review of Physiology* 69.
88. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., and Schäfer-Korting, M. 2001. *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
89. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47.
90. Jonas, A. 1991. Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1084:205-220.
91. Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., et al. 2000. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 24:192-196.
92. Schmitz, G., Kaminski, W.E., and Orso, E. 2000. ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol* 11:493-501.
93. Knight, B.L. 2004. ATP-binding cassette transporter A1: regulation of cholesterol efflux. *Biochem Soc Trans* 32:124-127.

94. Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520.
95. Mahley, R.W., Huang, Y., and Weisgraber, K.H. 2006. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest* 116:1226-1229.
96. Tilvis, R.S., and Miettinen, T.A. 1986. Serum plant sterols and their relation to cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr* 43:92-97.
97. Kuksis, A., Myher, J.J., Marai, L., Little, J.A., McArthur, R.G., and Roncari, D.A. 1986. Fatty acid composition of individual plasma sterol esters in phytosterolemia and xanthomatosis. *Lipids* 21:371-377.
98. Kuksis, A. 2001. Plasma non-cholesterol sterols. *J Chromatogr A* 935:203-236.
99. Kruit, J.K., Plosch, T., Havinga, R., Boverhof, R., Groot, P.H., Groen, A.K., and Kuipers, F. 2005. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 128:147-156.
100. Langheim, S., Yu, L., von Bergmann, K., Lütjohann, D., Xu, F., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. 2005. ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* 46:1732-1738.
101. Hazard, S.E., and Patel, S.B. 2006. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch*:1-8.
102. Arrese, M., and Ananthanarayanan, M. 2004. The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *Pflugers Arch* 449:123-131.
103. Macdonald, I., Bokkenheuser, V., Winter, J., McLernon, A., and Mosbach, E. 1983. Degradation of steroids in the human gut. *J. Lipid Res.* 24:675-700.
104. Miettinen, T.A., Ahrens, E.H., Jr., and Grundy, S.M. 1965. Quantitative Isolation and Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Total Dietary and Fecal Neutral Steroids. *J Lipid Res* 6:411-424.
105. Windler, E., Beil, F.U., and Greten, H. 1998. Fettstoffwechselerkrankungen. In *Innere Medizin*. M. Claasen, V. Diehl, and K. Kochsiek, editors. München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg. 940-956.
106. Pinedo, S., Vissers, M.N., von Bergmann, K., Elharchaoui, K., Lütjohann, D., Luben, R., Wareham, N.J., Kastelein, J.J., Khaw, K.T., and Boekholdt, S.M. 2006. 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.*
107. Assmann, G., Cullen, P., Erbey, J., Ramey, D.R., Kannenberg, F., and 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.
108. Glueck, C.J., Speirs, J., Tracy, T., Streicher, P., Illig, E., and 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.
109. Sudhop, T., Gottwald, B.M., and von Bergmann, K. 2002. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* 51:1519-1521.

110. Fassbender, K., Lütjohann, D., Dik, M.G., Bremmer, M., König, J., Walter, S., Liu, Y., Letiembre, M., von Bergmann, K., and Jonker, C. 2006. Moderately elevated plant sterol levels are associated with reduced cardiovascular risk-The LASA study. *Atherosclerosis*.
111. Wilund, K.R., Yu, L., Xu, F., Vega, G.L., Grundy, S.M., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. 2004. No association between plasma levels of plant sterols and atherosclerosis in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2326-2332.
112. Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Merz, C.N., Brewer, H.B., Jr., Clark, L.T., Hunninghake, D.B., Pasternak, R.C., Smith, S.C., Jr., and Stone, N.J. 2004. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110:227-239.
113. De Backer, G., Ambrosioni, E., Borch-Johnsen, K., Brotons, C., Cifkova, R., Dallongeville, J., Ebrahim, S., Faergeman, O., Graham, I., Mancina, G., et al. 2003. European guidelines on cardiovascular disease and prevention in clinical practice. *Atherosclerosis* 171:145-155.
114. 2005. *Fachinformation zu "Inegy"*: MSD, Essex Pharma.
115. Group, E.I.a.I. 2001. European Action on Secondary Prevention by Intervention to Reduce Events Clinical reality of coronary prevention guidelines: a comparison of EUROASPIRE I and II in nine countries. *Lancet* 357:995-1001.
116. Igel, M., Sudhop, T., and von Bergmann, K. 2001. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). *Eur J Clin Pharmacol* 57:357-364.
117. van Heek, M., Farley, C., Compton, D.S., Hoos, L., Alton, K.B., Sybertz, E.J., and Davis, H.R., Jr. 2000. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol* 129:1748-1754.
118. Garcia-Calvo, M., Lisnock, J., Bull, H.G., Hawes, B.E., Burnett, D.A., Braun, M.P., Crona, J.H., Davis, H.R., Jr., Dean, D.C., Detmers, P.A., et al. 2005. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8132-8137.
119. Bays, H. 2002. Ezetimibe. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1587-1604.
120. Clarenbach, J.J., Reber, M., Lütjohann, D., von Bergmann, K., and Sudhop, T. 2006. The lipid-lowering effect of ezetimibe in pure vegetarians. *J Lipid Res*.
121. Melani, L., Mills, R., Hassman, D., Lipetz, R., Lipka, L., LeBeaut, A., Suresh, R., Mukhopadhyay, P., and Veltri, E. 2003. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Eur Heart J* 24:717-728.
122. Davidson, M.H., Ballantyne, C.M., Kerzner, B., Melani, L., Sager, P.T., Lipka, L., Strony, J., Suresh, R., and Veltri, E. 2004. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with statins: randomised, placebo-controlled, blinded experience in 2382 patients with primary hypercholesterolemia. *Int J Clin Pract* 58:746-755.
123. Kerzner, B., Corbelli, J., Sharp, S., Lipka, L.J., Melani, L., LeBeaut, A., Suresh, R., Mukhopadhyay, P., and Veltri, E.P. 2003. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with lovastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 91:418-424.
124. Ballantyne, C.M., Hourii, J., Notarbartolo, A., Melani, L., Lipka, L.J., Suresh, R., Sun,

- S., LeBeaut, A.P., Sager, P.T., and Veltri, E.P. 2003. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation* 107:2409-2415.
125. Pearson, T.A., Denke, M.A., McBride, P.E., Battisti, W.P., Brady, W.E., and Palmisano, J. 2005. A community-based, randomized trial of ezetimibe added to statin therapy to attain NCEP ATP III goals for LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients: the ezetimibe add-on to statin for effectiveness (EASE) trial. *Mayo Clin Proc* 80:587-595.
126. Miettinen, T.A. 1991. Inhibition of cholesterol absorption by HMG-CoA reductase inhibitor. *Eur J Clin Pharmacol* 40 Suppl 1:S19-21.
127. Gylling, H., and Miettinen, T.A. 1996. Effects of inhibiting cholesterol absorption and synthesis on cholesterol and lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic non-insulin-dependent diabetic men. *J Lipid Res* 37:1776-1785.
128. Miettinen, T.A., and Gylling, H. 2003. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. *Eur J Clin Invest* 33:976-982.
129. Duane, W.C. 1993. Effects of lovastatin and dietary cholesterol on sterol homeostasis in healthy human subjects. *J Clin Invest* 92:911-918.
130. Salen, G., von Bergmann, K., Lütjohann, D., Kwiterovich, P., Kane, J., Patel, S.B., Musliner, T., Stein, P., and Musser, B. 2004. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation* 109:966-971.
131. Grundy, S.M., and Ahrens, E.H., Jr. 1969. Measurements of cholesterol turnover, synthesis, and absorption in man, carried out by isotope kinetic and sterol balance methods. *J Lipid Res* 10:91-107.
132. Samuel, P., Crouse, J.R., and Ahrens, E.H., Jr. 1978. Evaluation of an isotope ratio method for measurement of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 19:82-93.
133. Samuel, P., McNamara, D.J., Ahrens, E.H., Jr., Crouse, J.R., and Parker, T. 1982. Further validation of the plasma isotope ratio method for measurement of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 23:480-489.
134. Zilversmit, D.B. 1972. A single blood sample dual isotope method for the measurement of cholesterol absorption in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:862-865.
135. Zilversmit, D.B., and Hughes, L.B. 1974. Validation of a dual-isotope plasma ratio method for measurement of cholesterol absorption in rats. *J Lipid Res* 15:465-473.
136. Borgstrom, B. 1969. Quantification of cholesterol absorption in man by fecal analysis after the feeding of a single isotope-labeled meal. *J Lipid Res* 10:331-337.
137. Crouse, J.R., and Grundy, S.M. 1978. Evaluation of a continuous isotope feeding method for measurement of cholesterol absorption in man. *J Lipid Res* 19:967-971.
138. Grundy, S.M., and Mok, H.Y. 1977. Determination of cholesterol absorption in man by intestinal perfusion. *J Lipid Res* 18:263-271.
139. Pont, F., Duvillard, L., Verges, B., and Gambert, P. 1998. Development of Compartmental Models in Stable-Isotope Experiments : Application to Lipid Metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:853-860.
140. Keller, U. 1988. Welche Erkenntnisse bringen uns stabile Isotope in der klinischen Stoffwechselforschung? In *Stabile Isotope in der Ernährungsforschung*. J. Eckart, and

- G. Wolfram, editors. München: Zuckerschwerdt Verlag. 15-30.
141. Bosner, M.S., Ostlund, R.E., Jr., Osofisan, O., Grosklos, J., Fritschle, C., and Lange, L.G. 1993. Assessment of percent cholesterol absorption in humans with stable isotopes. *J Lipid Res* 34:1047-1053.
 142. Von Bergmann, K., Lütjohann, D., Lindenthal, B., and Steinmetz, A. 2003. Efficiency of intestinal cholesterol absorption in humans is not related to apoE phenotype. *J Lipid Res* 44:193-197.
 143. Miettinen, T.A., Tilvis, R.S., and Kesäniemi, Y.A. 1990. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am J Epidemiol* 131:20-31.
 144. Prange, W. 2001. Entwicklung einer gaschromatographisch / massenspektrometrischen Methode zur Analyse von Sterolen und Stanolen in menschlichem Serum und ihre Anwendung in klinischen Studien. Dissertation. *Mathematisch-Naturwissenschaftliche-Fakultät*. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
 145. Hübschmann, H.-J. 1996. *Handbuch der GC/MS*. Weinheim: VCH.
 146. Böcker, J. 1997. *Chromatographie*. Würzburg: Vogel-Buchverlag.
 147. Unger, K.K. 1989. *Handbuch der HPLC*. Darmstadt: GIT Verlag.
 148. Phillips, K.M., Ruggio, D.M., and Bailey, J.A. 1999. Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 732:17-29.
 149. Food and Drug Administration 2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
 150. Bressolle, F., Bromet-Petit, M., and Audran, M. 1996. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl* 686:3-10.
 151. Köhler, W., Schachtel, G., and Voleske, P. 1996. *Biostatistik*. Berlin Heidelberg: Springer.
 152. Kromidas, S. 1999. *Validierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH.
 153. Czubayko, F., Beumers, B., Lammsfuss, S., Lütjohann, D., and 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.
 154. Lindenthal, B., Simatupang, A., Dotti, M.T., Federico, A., Lütjohann, D., and von Bergmann, K. 1996. Urinary excretion of mevalonic acid as an indicator of cholesterol synthesis. *J Lipid Res* 37:2193-2201.
 155. Abel, L.L., Levy, B.B., Brodie, B.B., and Kendall, F.E. 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 195:357-366.
 156. Hoving, E.B. 1995. Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *J Chromatogr B Biomed Appl* 671:341-362.
 157. Shimada, K., Mitamura, K., and Higashi, T. 2001. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *J Chromatogr A* 935:141-172.
 158. Matthews, D.E., and Bier, D.M. 1983. Stable isotope methods for nutritional investigation. *Annu Rev Nutr* 3:309-339.

159. van Lieshout, M., West, C.E., and van Breemen, R.B. 2003. Isotopic tracer techniques for studying the bioavailability and bioefficacy of dietary carotenoids, particularly beta-carotene, in humans: a review. *Am J Clin Nutr* 77:12-28.
160. Horwitz, W. 1982. Evaluation of analytical methods for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry* 56:67A-76A.
161. Funk, W., Dammann, V., and Donnevert, G. 1992. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
162. Pedersen, T.R., and Tobert, J.A. 2004. Simvastatin: a review. *Expert Opin Pharmacother* 5:2583-2596.
163. Jakulj, L., Trip, M.D., Sudhop, T., von Bergmann, K., Kastelein, J.J., and Vissers, M.N. 2005. Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe: effects on plasma lipid levels. *J Lipid Res* 46:2692-2698.
164. Edwards, J.E., and Moore, R.A. 2003. Statins in hypercholesterolaemia: a dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomised, double blind trials. *BMC Fam Pract* 4:18.
165. Feldman, T., Koren, M., Insull, W., Jr., McKenney, J., Schrott, H., Lewin, A., Shah, S., Sidisin, M., Cho, M., Kush, D., et al. 2004. Treatment of high-risk patients with ezetimibe plus simvastatin co-administration versus simvastatin alone to attain National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III low-density lipoprotein cholesterol goals. *Am J Cardiol* 93:1481-1486.
166. Goldberg, A.C., Sapre, A., Liu, J., Capece, R., and Mitchel, Y.B. 2004. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc* 79:620-629.
167. Miettinen, T.A., Gylling, H., Lindbohm, N., Miettinen, T.E., Rajaratnam, R.A., and Relas, H. 2003. Serum noncholesterol sterols during inhibition of cholesterol synthesis by statins. *J Lab Clin Med* 141:131-137.
168. Miettinen, T.A., Strandberg, T.E., and Gylling, H. 2000. Noncholesterol sterols and cholesterol lowering by long-term simvastatin treatment in coronary patients: relation to basal serum cholestanol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1340-1346.
169. Lanfer, K., Igel, M., Sudhop, T., and von Bergmann, K. 2005. Serum plant sterols in patients with hypercholesterolemia during long-term treatment with atorvastatin and during 1-year co-administration of ezetimibe. *Perfusion* 18:70-71.
170. Miettinen, T.A., and Gylling, H. 2005. Effect of statins on noncholesterol sterol levels: implications for use of plant stanols and sterols. *Am J Cardiol* 96:40D-46D.
171. Grundy, S.M., Ahrens, E.H., Jr., and Davignon, J. 1969. The interaction of cholesterol absorption and cholesterol synthesis in man. *J Lipid Res* 10:304-315.
172. Igel, M., Sudhop, T., and von Bergmann, K. 2002. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol* 42:835-845.
173. Lindenthal, B., Sudhop, T., Schiedermaier, P., Agnan, M., Sauerbruch, T., and von Bergmann, K. 2002. Serum plant sterols and biliary cholesterol secretion in humans: studies with ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 43:1072-1077.
174. Watts, G.F., Chan, D.C., Barrett, P.H., O'Neill, F.H., and Thompson, G.R. 2003. Ef-

- fect of a statin on hepatic apolipoprotein B-100 secretion and plasma campesterol levels in the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:862-865.
175. Smahelova, A., Hyspler, R., Haas, T., Ticha, A., Blaha, V., and Zadak, Z. 2005. Effect of atorvastatin on non-cholesterol sterols in patients with type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Pharmacol Res* 51:31-36.
176. Gylling, H., Laaksonen, D.E., Atalay, M., Hallikainen, M., Niskanen, L., and Miettinen, T.A. 2006. Markers of absorption and synthesis of cholesterol in men with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*.
177. Hedman, M., Miettinen, T.A., Gylling, H., Ketomaki, A., and Antikainen, M. 2006. Serum noncholesterol sterols in children with heterozygous familial hypercholesterolemia undergoing pravastatin therapy. *J Pediatr* 148:241-246.
178. Rennie, M.J. 1999. An introduction to the use of tracers in nutrition and metabolism. *Proc Nutr Soc* 58:935-944.
179. Decker, P., Brinkmann, J.F., Lindenthal, B., Hirner, A., and von Bergmann, K. 1998. Evaluation of cholesterol absorption in rats using markers labeled with stable isotopes. Effect of complete bile diversion. *Hepatogastroenterology* 45:2033-2037.
180. Terry, J.G., McGill, B.L., and Crouse, J.R., 3rd. 1995. Evaluation of the use of beta-sitosteranol as a nonabsorbable marker for quantifying cholesterol absorption. *J Lipid Res* 36:2267-2271.
181. Hallikainen, M.A., Sarkkinen, E.S., Gylling, H., Erkkila, A.T., and Uusitupa, M.I. 2000. Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr* 54:715-725.
182. Weststrate, J.A., and Meijer, G.W. 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.
183. Muti, P., Awad, A.B., Schunemann, H., Fink, C.S., Hovey, K., Freudenheim, J.L., Wu, Y.W., Bellati, C., Pala, V., and Berrino, F. 2003. A plant food-based diet modifies the serum beta-sitosterol concentration in hyperandrogenic postmenopausal women. *J Nutr* 133:4252-4255.
184. Liebing, T. 2006. Entwicklung gaschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zur Untersuchung der intestinalen Cholesterinresorption und Bestimmung von Ursodesoxycholsäure sowie deren Anwendung in klinischen Studien. Dissertation. *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät*. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
185. Bhattacharyya, A.K., Connor, W.E., Lin, D.S., McMurry, M.M., and Shulman, R.S. 1991. Sluggish sitosterol turnover and hepatic failure to excrete sitosterol into bile cause expansion of body pool of sitosterol in patients with sitosterolemia and xanthomatosis. *Arterioscler Thromb* 11:1287-1294.
186. Ostlund, R.E., Jr., McGill, J.B., Zeng, C.M., Covey, D.F., Stearns, J., Stenson, W.F., and Spilburg, C.A. 2002. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytosteranols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E911-916.
187. Repa, J.J., Dietschy, J.M., and Turley, S.D. 2002. Inhibition of cholesterol absorption by SCH 58053 in the mouse is not mediated via changes in the expression of mRNA

- for ABCA1, ABCG5, or ABCG8 in the enterocyte. *J Lipid Res* 43:1864-1874.
188. Yu, L., von Bergmann, K., Lütjohann, D., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. 2005. Ezetimibe normalizes metabolic defects in mice lacking ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 46:1739-1744.

ANHANG

Tabelle A1 Deuterierte und natürliche Sterole im Serum von 33 männlichen Studienteilnehmern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, SIMVA (Simvastatin; 20 mg/d), EZE (Ezetimib; 10 mg/d) und SIMVA/EZE (Simvastatin plus Ezetimib; 20/10 mg/d). Die Daten von Probanden 203, 212, 222 und 239 wurden nicht in die statistische Datenauswertung einbezogen. Werte für D₆-Sterole sind dosiskorrigiert.

Proband	D ₆ -Cholesterol (µg/dl)				Cholesterol (mg/dl)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	127,60	75,96	56,43	28,24	290	200	217	173
202	77,52	47,81	24,59	20,87	262	193	216	154
203	19,08	17,63	18,98	12,59	251	140	222	185
205	73,38	49,30	35,90	28,25	222	152	218	150
206	49,20	51,25	20,06	11,90	205	175	199	156
207	50,04	48,32	18,26	11,33	177	139	167	103
208	50,95	35,20	16,22	12,51	214	144	177	117
209	51,88	34,84	27,49	17,79	224	162	190	142
210	63,89	48,50	21,18	22,26	256	148	195	121
211	38,23	38,70	15,58	16,01	212	169	201	138
212	17,36	16,00	12,72	9,98	187	141	156	134
213	42,10	22,13	19,61	16,19	267	144	242	158
214	48,45	34,92	22,45	19,11	236	188	211	159
215	61,64	41,17	21,67	10,86	234	180	199	132
216	101,27	78,18	29,36	27,32	298	210	233	145
218	60,52	37,87	31,78	21,73	250	164	207	167
219	76,02	57,06	33,11	21,45	281	203	200	143
220	96,26	69,96	25,47	33,96	257	147	194	161
221	72,86	54,94	36,02	27,76	306	207	278	184
222	64,00	48,29	27,94	8,84	352	310	266	196
223	68,83	65,76	21,09	22,35	224	174	221	137
224	60,69	54,66	24,15	20,19	282	214	230	174
225	103,86	73,46	47,44	36,35	287	200	241	173
226	71,81	45,70	25,78	13,79	207	175	177	133
227	39,96	28,13	19,97	16,53	244	153	196	159
228	70,06	70,50	35,71	31,67	251	194	222	169
229	118,36	79,89	41,22	45,78	370	267	273	250*
230	64,54	51,56	18,24	21,07	250	162	193	147
231	74,56	47,01	36,30	21,17	266	173	270	163
233	92,42	107,99	24,02	31,82	263	244	251	176
234	78,25	47,72	42,19	16,82	272	216	266	166
236	57,03	58,43	20,87	20,28	232	168	170	142
237	85,31	55,76	36,48	15,37	223	140	201	126
238	80,35	52,65	35,10	29,07	329	171	251	158
239	64,43	53,75	34,34	32,10	221	146	215	203
240	61,97	54,42	30,53	17,59	208	182	198	129
241	53,32	45,09	21,01	17,05	251	194	199	102

*Ausreißer nach Test von Grubbs auf dem 99 %-Signifikanzniveau

Tabelle A1 Fortsetzung

Proband	D ₆ -Campesterol (µg/dl)				Campesterol (mg/dl)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	11,721	8,922	3,873	2,841	0,490	0,408	0,133	0,106
202	6,562	6,651	3,184	2,909	0,344	0,400	0,176	0,156
203	1,578	2,161	2,237	1,249	0,260	0,131	0,115	0,139
205	10,214	9,714	4,052	2,889	0,431	0,479	0,223	0,133
206	3,974	6,417	1,663	1,062	0,253	0,241	0,094	0,069
207	7,139	7,172	1,989	1,389	0,517	0,415	0,119	0,110
208	5,696	3,850	1,481	1,016	0,214	0,168	0,065	0,070
209	5,675	5,509	3,169	2,778	0,390	0,425	0,187	0,175
210	8,585	7,704	2,723	2,678	0,406	0,365	0,109	0,110
211	6,100	5,836	1,634	2,064	0,731	0,530	0,154	0,148
212	1,560	1,895	0,941	0,971	0,244	0,168	0,123	0,098
213	4,672	3,476	2,389	1,899	0,190	0,151	0,096	0,065
214	6,669	7,334	2,357	2,436	0,297	0,417	0,029	0,013
215	8,821	5,660	2,361	1,111	0,408	0,283	0,104	0,046
216	15,991	12,716	3,027	3,868	0,620	0,736	0,141	0,161
218	7,306	7,614	3,886	3,470	0,738	0,763	0,274	0,217
219	10,420	11,906	3,847	3,120	0,941	0,988	0,283	0,221
220	18,469	17,374	4,043	4,685	1,460	0,912	0,393	0,308
221	7,439	8,529	2,915	3,010	0,265	0,436	0,119	0,091
222	6,958	6,255	2,338	0,714	0,266	0,383	0,157	0,101
223	12,183	11,173	2,363	2,513	0,428	0,510	0,116	0,172
224	7,952	8,285	2,204	1,893	0,435	0,370	0,096	0,121
225	14,391	13,061	5,702	5,609	1,101	0,863	0,354	0,287
226	10,951	10,236	2,122	2,288	0,602	1,013	0,190	0,267
227	4,721	4,031	2,510	1,657	0,181	0,182	0,100	0,075
228	10,833	11,904	4,167	4,643	0,586	0,667	0,254	0,288
229	14,112	8,973	4,175	4,811	0,755	0,482	0,216	0,266
230	8,481	8,931	1,609	1,517	0,583	0,489	0,142	0,133
231	7,041	6,292	2,373	1,919	0,297	0,442	0,101	0,096
233	14,444	14,839	2,653	3,127	0,863	0,839	0,200	0,150
234	10,857	7,274	3,925	1,651	0,745	0,549	0,272	0,189
236	9,346	8,272	2,347	2,486	0,647	0,317	0,166	0,119
237	10,720	11,179	4,240	2,291	0,283	0,381	0,102	0,077
238	13,355	7,832	4,568	3,613	0,973	0,457	0,194	0,131
239	12,803	14,790	4,598	5,337	0,876	1,058	0,312	0,463
240	11,237	10,818	3,163	1,627	0,810	0,888	0,134	0,079
241	5,647	5,590	2,682	2,313	0,455	0,534	0,205	0,097

Tabelle A1 Fortsetzung

Proband	D ₆ -Sitosterol (µg/dl)				Sitosterol (mg/dl)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	2,945	2,352	1,090	0,924	0,304	0,235	0,105	0,080
202	1,736	1,931	1,012	0,824	0,189	0,212	0,149	0,117
203	0,527	0,817	0,850	0,781	0,175	0,087	0,102	0,121
205	2,834	2,684	1,266	0,887	0,287	0,307	0,159	0,111
206	1,178	1,682	0,771	0,620	0,162	0,203	0,077	0,064
207	1,860	1,844	0,893	0,744	0,247	0,203	0,099	0,089
208	1,669	1,289	0,693	0,604	0,163	0,147	0,067	0,073
209	1,685	1,805	1,244	1,242	0,261	0,282	0,171	0,186
210	2,139	1,892	0,736	0,740	0,238	0,212	0,096	0,080
211	1,865	1,776	0,802	0,932	0,352	0,248	0,116	0,110
212	0,461	0,635	0,312	0,440	0,149	0,103	0,079	0,064
213	1,429	1,379	1,100	1,068	0,158	0,126	0,107	0,059
214	1,585	2,103	0,331	0,383	0,243	0,275	0,038	0,047
215	1,942	1,306	0,736	0,418	0,243	0,157	0,083	0,034
216	4,087	3,003	0,942	1,150	0,402	0,413	0,089	0,125
218	1,339	1,704	0,518	0,483	0,346	0,412	0,139	0,114
219	2,117	2,609	0,650	0,569	0,409	0,467	0,137	0,139
220	4,494	5,273*	1,445	1,600	0,692	0,456	0,232	0,205
221	1,867	2,345	0,740	0,820	0,238	0,321	0,124	0,115
222	1,382	1,259	0,414	0,072	0,187	0,194	0,128	0,062
223	3,163	2,897	0,801	0,664	0,260	0,298	0,100	0,115
224	1,650	2,013	0,510	0,422	0,320	0,296	0,121	0,117
225	3,089	2,833	1,474	1,323	0,482	0,345	0,199	0,182
226	2,823	2,925	0,681	0,712	0,322	0,508	0,124	0,177
227	1,402	1,273	0,871	0,515	0,255	0,221	0,137	0,150
228	2,694	3,035	1,067	1,331	0,336	0,377	0,190	0,237
229	4,036	1,998	1,210	1,472	0,461	0,224	0,150	0,173
230	1,718	2,234	0,373	0,301	0,324	0,253	0,096	0,093
231	1,456	1,318	0,502	0,485	0,172	0,225	0,076	0,082
233	3,283	3,454	0,723	0,914	0,517	0,469	0,116	0,089
234	2,473	1,688	0,812	0,361	0,399	0,337	0,186	0,136
236	2,248	1,911	0,474	0,648	0,314	0,175	0,108	0,088
237	2,356	2,960	1,047	0,634	0,219	0,291	0,113	0,076
238	3,393	2,080	1,333	1,230	0,437	0,199	0,112	0,080
239	3,241	3,905	1,473	1,772	0,349	0,498	0,153	0,227
240	2,436	2,489	0,567	0,085	0,515	0,659	0,145	0,081
241	0,960	0,886	0,420	0,196	0,213	0,211	0,113	0,056

* Ausreißer nach Test von Grubbs auf dem 99 %-Signifikanzniveau

Tabelle A1 Fortsetzung

Proband	D ₆ -Campesterol/Campesterol (µg/mg)				D ₆ -Sitosterol/Sitosterol (µg/mg)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	23,9	21,9	29,0	26,8	9,7	10,0	10,4	11,6
202	19,1	16,6	18,0	18,7	9,2	9,1	6,8	7,1
203	6,1	16,5	19,4	9,0	3,0	9,3	8,3	6,4
205	23,7	20,3	18,2	21,8	9,9	8,8	8,0	8,0
206	15,7	26,6	17,8	15,5	7,3	8,3	10,1	9,7
207	13,8	17,3	16,8	12,7	7,5	9,1	9,0	8,3
208	26,7	22,9	22,9	14,6	10,2	8,7	10,3	8,3
209	14,6	13,0	17,0	15,8	6,4	6,4	7,3	6,7
210	21,1	21,1	25,1	24,3	9,0	8,9	7,7	9,3
211	8,3	11,0	10,6	14,0	5,3	7,2	6,9	8,5
212	6,4	11,3	7,7	9,9	3,1	6,1	4,0	6,9
213	24,6	23,0	24,9	29,4	9,1	11,0	10,2	18,2
214	22,4	17,6	(80,8*)	(185,4*)	6,5	7,6	8,6	8,2
215	21,6	20,0	22,6	24,2	8,0	8,3	8,9	12,4
216	25,8	17,3	21,5	24,0	10,2	7,3	10,5	9,2
218	9,9	10,0	14,2	16,0	3,9	4,1	3,7	4,2
219	11,1	12,0	13,6	14,1	5,2	5,6	4,8	4,1
220	12,7	19,1	10,3	15,2	6,5	11,6	6,2	7,8
221	28,1	19,6	24,5	33,0	7,8	7,3	6,0	7,1
222	26,2	16,3	14,9	7,0	7,4	6,5	3,2	1,2
223	28,5	21,9	20,4	14,6	12,2	9,7	8,0	5,8
224	18,3	22,4	22,9	15,6	5,2	6,8	4,2	3,6
225	13,1	15,1	16,1	19,5	6,4	8,2	7,4	7,3
226	18,2	10,1	11,2	8,6	8,8	5,8	5,5	4,0
227	26,0	22,1	25,2	22,0	5,5	5,8	6,4	3,4
228	18,5	17,8	16,4	16,1	8,0	8,0	5,6	5,6
229	18,7	18,6	19,3	18,1	8,8	8,9	8,1	8,5
230	14,6	18,3	11,4	11,4	5,3	8,8	3,9	3,2
231	23,7	14,2	23,6	20,0	8,5	5,9	6,6	5,9
233	16,7	17,7	13,3	20,8	6,3	7,4	6,2	10,2
234	14,6	13,3	14,4	8,7	6,2	5,0	4,4	2,7
236	14,4	26,1	14,1	20,9	7,2	10,9	4,4	7,4
237	37,8	29,3	41,5*	29,6	10,7	10,2	9,2	8,3
238	13,7	17,2	23,5	27,6	7,8	10,4	11,9	15,5
239	14,6	14,0	14,7	11,5	9,3	7,8	9,6	7,8
240	13,9	12,2	23,5	20,5	4,7	3,8	3,9	1,1
241	12,4	10,5	13,1	23,9	4,5	4,2	3,7	3,5

(*) Ausreißer nach Test von Grubbs auf dem 99 %-Signifikanzniveau, die von der statistischen Datenanalyse ausgeschlossen wurden

Tabelle A1 Fortsetzung

Proband	Campesterol/Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)				Sitosterol/Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	1,690	2,038	0,616	0,613	1,047	1,173	0,484	0,461
202	1,314	2,072	0,816	1,014	0,721	1,099	0,687	0,758
203	1,035	0,937	0,520	0,752	0,696	0,625	0,461	0,655
205	1,937	3,149	1,021	0,884	1,291	2,015	0,727	0,737
206	1,235	1,384	0,470	0,441	0,790	1,164	0,385	0,411
207	2,919	2,989	0,711	1,059	1,393	1,464	0,594	0,864
208	0,999	1,166	0,367	0,598	0,764	1,021	0,381	0,625
209	1,741	2,623	0,985	1,239	1,168	1,742	0,902	1,316
210	1,585	2,461	0,557	0,908	0,930	1,427	0,490	0,659
211	3,444	3,131	0,767	1,073	1,661	1,462	0,576	0,795
212	1,304	1,191	0,786	0,733	0,797	0,734	0,505	0,478
213	0,710	1,052	0,396	0,409	0,591	0,876	0,444	0,372
214	1,263	2,217	0,138	0,082	1,031	1,462	0,182	0,294
215	1,745	1,578	0,523	0,349	1,040	0,875	0,416	0,255
216	2,079	3,509	0,604	1,107	1,347	1,968	0,384	0,858
218	2,952	4,654	1,321	1,298	1,386	2,511	0,670	0,683
219	3,353	4,877	1,414	1,550	1,456	2,304	0,683	0,978
220	5,685*	6,223	2,026*	1,909	2,695	3,111	1,198	1,271
221	0,865	2,110	0,428	0,497	0,777	1,552	0,444	0,625
222	0,754	1,235	0,589	0,518	0,530	0,625	0,483	0,316
223	1,909	2,921	0,523	1,260	1,158	1,708	0,455	0,836
224	1,544	1,724	0,419	0,695	1,136	1,380	0,524	0,669
225	3,839	4,319	1,470	1,657	1,679	1,724	0,826	1,049
226	2,908	5,788	1,072	2,016	1,553	2,901	0,700	1,333
227	0,743	1,190	0,507	0,472	1,045	1,444	0,696	0,943
228	2,332	3,432	1,146	1,706	1,337	1,940	0,855	1,400
229	2,039	1,803	0,792	1,063	1,243	0,838	0,549	0,691
230	2,331	3,019	0,733	0,902	1,298	1,560	0,497	0,629
231	1,117	2,550	0,373	0,588	0,645	1,299	0,280	0,503
233	3,283	3,444	0,795	0,852	1,967	1,925	0,461	0,507
234	2,744	2,544	1,023	1,142	1,468	1,563	0,700	0,820
236	2,788	1,882	0,978	0,839	1,353	1,037	0,632	0,621
237	1,269	2,724	0,509	0,615	0,983	2,076	0,564	0,608
238	2,956	2,671	0,774	0,829	1,326	1,166	0,445	0,504
239	3,960	7,233	1,449	2,277	1,577	3,403	0,710	1,116
240	3,894	4,886	0,678	0,613	2,472	3,623	0,730	0,626
241	1,809	2,758	1,032	0,951	0,849	1,088	0,568	0,548

* Ausreißer nach Test von Grubbs auf dem 99 %-Signifikanzniveau

Tabelle A1 Fortsetzung

Proband	D ₆ -Campesterol/Cholesterol (ng/mg)				D ₆ -Sitosterol/Cholesterol (ng/mg)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	40,38	44,54	17,87	16,42	10,15	11,74	5,03	5,34
202	25,08	34,46	14,73	18,92	6,63	10,01	4,68	5,36
203	6,28	15,44	10,08	6,74	2,10	5,84	3,83	4,22
205	45,92	63,84	18,58	19,25	12,74	17,63	5,81	5,91
206	19,36	36,77	8,35	6,82	5,74	9,64	3,87	3,98
207	40,33	51,61	11,92	13,42	10,51	13,27	5,35	7,19
208	26,64	26,65	8,39	8,72	7,80	8,92	3,92	5,19
209	25,35	34,03	16,72	19,62	7,53	11,15	6,56	8,77
210	33,50	51,97	13,96	22,07	8,35	12,77	3,78	6,10
211	28,75	34,46	8,13	14,97	8,79	10,48	3,99	6,77
212	8,34	13,45	6,02	7,23	2,47	4,51	2,00	3,27
213	17,50	24,17	9,88	12,05	5,35	9,59	4,55	6,78
214	28,31	38,95	11,18	15,27	6,73	11,17	1,57	2,40
215	37,74	31,53	11,85	8,43	8,31	7,28	3,70	3,17
216	53,61	60,63	13,01	26,62	13,70	14,32	4,05	7,92
218	29,23	46,44	18,75	20,75	5,36	10,39	2,50	2,89
219	37,12	58,77	19,21	21,88	7,54	12,88	3,25	3,99
220	71,92	118,57*	20,87	29,03	17,50	35,99*	7,46	9,91
221	24,30	41,28	10,48	16,38	6,10	11,35	2,66	4,46
222	19,75	20,18	8,79	3,65	3,92	4,06	1,56	0,37
223	54,31	64,04	10,70	18,36	14,10	16,60	3,63	4,85
224	28,22	38,64	9,57	10,85	5,85	9,39	2,22	2,42
225	50,16	65,34	23,66	32,37	10,77	14,17	6,12	7,64
226	52,90	58,49	11,98	17,25	13,64	16,71	3,84	5,37
227	19,35	26,30	12,78	10,40	5,74	8,31	4,44	3,23
228	43,14	61,23	18,79	27,48	10,73	15,61	4,81	7,88
229	38,10	33,60	15,32	19,24	10,90	7,48	4,44	5,89
230	33,94	55,18	8,33	10,29	6,88	13,80	1,93	2,04
231	26,44	36,29	8,79	11,79	5,47	7,60	1,86	2,98
233	54,92	60,89	10,56	17,74	12,48	14,17	2,88	5,18
234	39,96	33,71	14,77	9,96	9,10	7,82	3,06	2,18
236	40,28	49,16	13,80	17,52	9,69	11,35	2,79	4,57
237	48,03	79,86	21,12	18,22	10,56	21,14	5,21	5,04
238	40,56	45,82	18,21	22,86	10,30	12,17	5,31	7,78
239	57,88	101,11	21,35	26,28	14,65	26,69	6,84	8,72
240	53,99	59,50	15,94	12,58	11,70	13,69	2,86	0,66
241	22,48	28,86	13,47	22,73	3,82	4,57	2,11	1,92

* Ausreißer nach Test von Grubbs auf dem 99 %-Signifikanzniveau

Tabelle A1 Fortsetzung

Proband	D ₆ -Cholesterol/Cholesterol (ng/mg)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	440	379	260*	163
202	296	248	114	136
203	76	126	86	68
205	330	324	165	188
206	240	294	101	76
207	283	348	109	109
208	238	244	92	107
209	232	215	145	126
210	249	327	109	183
211	180	229	77	116
212	93	114	81	74
213	158	154	81	103
214	206	185	107	120
215	264	229	109	82
216	340	373	126	188
218	242	231	153	130
219	271	282	165	150
220	375	477	131	210
221	238	266	129	151
222	182	156	105	45
223	307	377	95	163
224	215	255	105	116
225	362	368	197	210
226	347	261	145	104
227	164	183	102	104
228	279	363	161	187
229	320	299	151	183
230	258	319	94	143
231	280	271	134	130
233	351	443	96	181
234	288	221	159	101
236	246	347	123	143
237	382	398	182	122
238	244	308	140	184
239	291	367	159	158
240	298	299	154	136
241	212	233	106	168

* Ausreißer nach Test von Grubbs auf dem 99 %-Signifikanzniveau

Tabelle A2 Cholesterolerorption und Cholesterolsynthese von 33 männlichen Studienteilnehmern mit leichter Hypercholesterolämie unter der Behandlung mit Placebo, SIMVA (Simvastatin; 20 mg/d), EZE (Ezetimib; 10 mg/d) und SIMVA/EZE (Simvastatin plus Ezetimib; 20/10 mg/d). Die Daten von Probanden 203, 212, 222 und 239 wurden nicht in die statistische Datenauswertung einbezogen

Proband	Cholesterolerorption (%)				Cholesterolsynthese (mg/d)			
	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI	PBO	SIMVA	EZE	KOMBI
201	53,5	61,0	25,6	18,0	482	338	1305	1163
202	50,0	50,4	11,9	14,0	756	754	2834	1589
203	52,0	56,0	36,4	44,0	3895	1826	2110	4409
205	49,2	53,5	12,7	18,6	1127	1036	1625	1624
206	40,7	46,1	6,9	4,4	1067	859	2311	2001
207	53,7	53,2	20,4	20,1	727	896	1600	1430
208	39,2	41,2	20,4	8,0	1387	1407	3289	2566
209	39,4	44,7	32,2	28,3	766	962	1336	1418
210	49,0	42,7	28,3	24,5	641	324	2105	932
211	41,5	59,1	20,0	32,9	318	490	1202	726
212	24,9	22,1	13,4	6,7	3232	2046	2290	4297
213	38,1	34,7	11,1	8,1	1409	1496	3916	2790
214	30,3	42,9	19,9	17,6	1481	947	1760	1449
215	64,0	57,3	38,4	36,1	573	550	1390	864
216	58,8	53,7	15,6	34,4	675	448	1399	1022
218	46,0	45,0	40,4	38,4	697	616	1146	1087
219	52,9	59,3	34,2	36,2	847	644	1486	1272
220	66,5	65,7	39,0	32,3	276	213	1614	1454
221	44,8	55,7	21,6	27,6	963	626	1678	1311
222	53,5	56,2	22,8	22,2	3160	3722	4645	5813
223	62,9	56,5	26,6	22,0	638	508	1979	1182
224	58,5	53,0	22,7	26,0	840	1132	1600	1866
225	57,5	65,8	35,0	40,5	735	535	1268	1068
226	55,3	50,3	24,0	34,3	742	889	1994	1221
227	25,9	46,3	15,0	32,2	1686	1591	1972	3331
228	53,8	61,7	19,6	15,6	906	682	2542	2105
229	62,1	61,3	36,4	33,7	915	739	2111	1266
230	48,2	48,2	14,5	14,0	854	961	2598	2252
231	48,5	50,0	8,3	36,2	1216	1012	2450	1549
233	57,4	61,2	25,8	25,2	662	766	1924	1472
234	53,9	59,0	37,4	22,8	967	779	1133	1669
236	56,9	67,9	12,5	13,5	730	729	1822	2394
237	46,3	49,6	4,3	10,2	466	419	1055	1535
238	40,9	38,3	10,8	15,4	1487	1119	1746	1227
239	58,5	52,3	10,7	12,9	2004	10280	1413	1223
240	59,7	57,3	10,8	12,3	673	830	1911	1614
241	43,5	37,7	2,0	22,5	1202	1347	2449	1779

Tabelle A3 Alter, Größe, Gewicht und BMI der 37 männlichen Studienteilnehmer. Die Daten von Probanden 203, 212, 222 und 239 wurden nicht in die statistische Datenauswertung einbezogen

Proband	Alter	Größe	Gewicht	BMI
201	45	70	177	22,3
202	37	86	189	24,2
203	46	91	180	28,2
205	42	67	179	21,0
206	53	81	179	25,1
207	49	81	174	27,2
208	27	88	187	25,2
209	23	94	183	28,0
210	44	83	172	28,2
211	37	110	195	29,0
212	35	108	188	30,4
213	48	92	180	28,2
214	41	96	189	26,7
215	42	85	185	24,9
216	28	69	177	22,0
218	38	94	191	25,9
219	51	89	182	26,8
220	35	79	182	23,9
221	47	80	182	24,3
222	41	72	176	23,3
223	28	84	187	24,3
224	37	75	184	22,1
225	55	69	168	24,6
226	33	96	183	28,8
227	45	85	176	27,3
228	38	77	185	22,6
229	29	83	183	24,7
230	40	93	186	26,9
231	39	77	172	26,2
233	55	87	176	27,9
234	45	73	184	21,6
236	38	87	188	24,9
237	30	69	176	22,1
238	48	73	182	22,2
239	40	76	174	25,3
240	31	75	184	22,0
241	30	99	185	28,9