

Die hepatische Clearance von Cholesterin,
Cholestanol, pflanzlichen Sterinen und Stanolen
bei Patienten mit Lebererkrankungen

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

vorgelegt von Sabine Karsten
aus Neuss

Erscheinungsjahr: 2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus von Bergmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer Düsing

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2007

Aus der Klinischen Pharmakologie der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann
(ehemaliger Direktor Prof. Dr. med. Klaus von Bergmann)

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

Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	7
MAßE UND EINHEITEN	7
1. EINLEITUNG	9
1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit	9
1.2 Grundlagen über Transporte von Substanzen über Zellmembranen	10
1.3 Transporter aus der ABC-Familie	11
1.4 Transporter der ABCG-Familie und ihre Regulation	11
1.5 Sterine und Stanole	12
1.6 Vorkommen und Resorption von Sterinen und Stanolen	14
1.7 Funktion von Cholesterin, pflanzlichen Sterinen und Stanolen	15
1.8 Die Leber und ausgewählte Lebererkrankungen	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial	18
2.2 Patienten	19
2.2.1 Probengewinnung	19
2.3 Methoden	20
2.3.1 Aufarbeitung der Proben	20
2.3.2 Gaschromatographisch-massenspektroskopische Analysen	21
2.3.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase	22
2.4 Auswertung	22
2.4.1 Berechnung der Konzentrationen	22
2.4.2 Berechnung der Clearance	23
2.5 Statistik	23
3. ERGEBNISSE	24
3.1 Klinische Daten	24
3.2 Serumkonzentrationen	26
3.3 Gallekonzentrationen	28

3.4 Clearance	30
4. DISKUSSION	34
5. ZUSAMMENFASSUNG	40
6. LITERATURVERZEICHNIS	42
7. DANKSAGUNG	46
8. LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungen

ACAT	Acyl-CoA-Cholesterylacyl-Transferase
ABCG	ATP-binding-cassette der Familie G
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
BHT	2,6 Di-tertiär-butyl-4-methylphenol
BMI	Body mass index
Cl	Clearance
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GTP	Guanosin-Triphosphat
Konz.	Konzentration
LDL	low density lipoproteins
Lsg.	Lösung
LXR	liver x receptor
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
N ₂	Stickstoff
p.a.	pro analysi
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
TMS	Trimethylsilyether
VLDL	very low density lipoproteins

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer

mm	Millimeter
cm	Zentimeter
m ²	Quadratmeter
Da	Dalton
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
sec	Sekunde
min	Minuten
h	Stunde
kg	Kilogramm
psi	pound-force per square inch
U	Units
m/z	Masse pro Ladungseinheit

1. Einleitung

1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Transportvorgänge in der Leber und im Darm spielen bei der Ausscheidung vieler Substanzen eine entscheidende Rolle. Die Elimination von Sterinen und Stanolen wie Cholesterin, Cholestanol, Sitosterin, Campesterin, Stigmasterin, Brassicasterin, Sitostanol und Campestanol über die Leber ist jedoch sehr unterschiedlich, wie Untersuchungen zu diesem Thema bei gesunden Probanden bereits gezeigt haben [1].

Bekannt ist, dass Sterine und Stanole durch den Nieman-Pick C1 like 1 Transporter aktiv aus dem Darmlumen in die Mukosazellen des Darmes gelangen [2, 3]. Anschließend werden sie verestert und in Apo B 48 eingebaut und gelangen als Chylomikronen in die Lymphe und von dort in die systemische Zirkulation. Ein Teil der in die Mukosa aufgenommenen Sterine und Stanole werden jedoch Substrate des energieabhängigen Transportersystems ABCG5/G8 (ATP-Binding-Cassette), das diese Substanzen über die Zellmembran in das Darmlumen zurück transportiert [4, 5]. Mit diesem System werden Sterine und Stanole aktiv aus der Mukosazelle zurück ins Darmlumen beziehungsweise aus der kanalikulären Membran in die Galle transportiert. Trotz der großen Strukturähnlichkeit der Sterine weisen diese jedoch ganz verschiedene Affinitäten zum ABCG5/G8 Transporter auf, woraus sich die unterschiedliche Resorption und biliäre Elimination der einzelnen Sterine und Stanole erklärt [6, 7].

Welchen Einfluss Erkrankungen des hepatobiliären Systems und die Einnahme von Medikamenten auf die Clearance der einzelnen Sterine und Stanole haben ist bislang nicht systematisch untersucht worden.

In der vorliegenden Arbeit galt es daher zu untersuchen, wie sich die hepatische Clearance von Sterinen und Stanolen bei Patienten mit Lebererkrankungen verhält. Zu diesem Zweck wurden sechs Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen des hepatobiliären Systems in die Studie aufgenommen. Von diesen Patienten erhielten drei Medikamente, die den Fettstoffwechsel beeinflussen. Dies eröffnete die Chance, neue Erkenntnisse über die hepatische Clearance bei einem gemischten Patientenklientel zu gewinnen.

Ziel der Arbeit war es, die hepatische Clearance von Sterinen und Stanolen bei einem Patientenkollektiv mit Lebererkrankungen zu ermitteln, und mit bereits aus der Literatur

bekanntesten Daten von gesunden Probanden zu vergleichen. Dies auch vor dem Hintergrund der Frage wie bei Patienten mit unterschiedlicher Leberfunktion der Stoffwechsel von pflanzlichen Sterinen und Stanolen beeinflusst wird.

1.2 Grundlagen über Transporte von Substanzen über Zellmembranen

Jeder Nahrungsbestandteil und jeder endogene Stoff, der in eine Zelle hinein oder aus ihr heraus gelangen soll, muss über die Zellmembran transportiert werden. Viele dieser Stoffe werden durch spezielle Transportsysteme beeinflusst. Zu den wichtigsten Aufgaben dieser Transportsysteme gehören die Anreicherung von Energieträgern und Baustoffen aus der Umgebung sowie die Elimination von Schadstoffen und der Erhalt eines Ionengradienten, der für die Erregbarkeit von Nerven und Muskelzellen unerlässlich ist. Die verschiedenen Varianten dieser Transportsysteme sind in zwei große Klassen einzuteilen. Der passive Transport benötigt keine Energie und erfolgt mit dem Konzentrationsgradienten. Im Gegensatz dazu steht der aktive Transport, bei dem ein Stoff mit Hilfe von Energie gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert wird.

Zum passiven Transport zählen die freie Diffusion, die nur für Wasser und nichtpolare Moleküle möglich ist, und die erleichterte (passive) Diffusion. Charakteristisch für die erleichterte Diffusion ist eine begrenzte Kapazität durch das begrenzte Vorhandensein von Träger-Proteinen (Carrier) oder Ionenkanälen. Diese Möglichkeit des Transports ist also sättigbar.

Beim aktiven Transport werden durch den Einsatz von Energie Teilchen gegen das Konzentrationsgefälle transportiert.

Beim primär-aktiven Transport ist der Transport direkt an eine energieliefernde chemische Reaktion gebunden. Beispiele für diese Reaktion sind die Natrium-Kalium-Pumpe und die Wasserstoff-Sekretion in den Belegzellen der Magenschleimhaut. Die Energie wird durch die Spaltung von Adenosin-Triphosphat (ATP) gewonnen.

Der sekundär-aktive Transport hat die Besonderheit, dass die Energie nicht in Form von ATP, sondern durch ein physikalisches Potential gewährleistet wird. Die Triebkraft für den Transport eines Stoffes gegen den Konzentrationsgradienten ist der gleichzeitige Transport eines anderen Stoffes mit dem Gefälle. Dies kann im Co-Transport (Synport) oder im Gegentransport (Antiport) geschehen. Beispiele sind die Aufnahme von Glukose oder Aminosäuren im Intestinaltrakt oder im Tubulussystem der Niere.

Die nachfolgend vorgestellten Proteine aus der ABC-Transporter-Familie gehören in die Klasse des primär-aktiven Transports. Die notwendige Energie wird durch Spaltung von ATP gewonnen. Im Rahmen der Studie waren diese Transporter von besonderer Bedeutung.

1.3 Transporter aus der ABC-Familie

ABC-Transporter sind eine große Gruppe von Transportern, für die gemeinsam gilt, dass sie Substanzen mit Hilfe von ATP gegen den Konzentrationsgradienten durch biologische Membranen transportieren. Transporter dieser Familie hat man in vielen verschiedenen Spezies gefunden. Bisher sind 48 solcher Transportproteine beim Menschen bekannt [8].

Ein typischer ABC-Transporter besteht aus vier membranassoziierten Domänen, von denen zwei hydrophob sind. Jede der hydrophoben Domänen besteht wiederum aus sechs transmembranösen Segmenten [9]. Entscheidend für die Zugehörigkeit zu dieser Familie ist ein 200-250 Aminosäuren langer Bereich, in dem ATP gebunden wird [9].

Proteine der ABC-Transporter-Familie transportieren eine Vielzahl endogener und exogener Stoffe. Für die Ausscheidung von Sterinen und Stanolen sind die Transporter der Familie G wichtig.

1.4 Transporter der ABCG-Familie und ihre Regulation

Die ABCG-Transporterfamilie besteht aus fünf vollständig charakterisierten Mitgliedern [10]. Die für diese Studie wichtigen Transporter sind ABCG5 und ABCG8. Es sind Halbtransporter die als Heterodimer eine Funktionseinheit bilden [10]. Jeder dieser Halbtransporter besteht aus 6 Transmembrandomänen am Carboxylende und einer ATP-Bindungsstelle am Aminoende [4, 5], daraus folgt, dass ein Volltransporter aus 12 Transmembrandomänen und 2 ATP-Bindungsstellen besteht. Die Gene für den ABCG5/G8 Transporter sind auf Chromosom 2 lokalisiert, wo sie von demselben Promoter reguliert werden [11]. ABCG5/G8 werden in den Dünndarm und die Leber exprimiert, dort transportieren sie Sterine und Stanole zurück in das Dünndarlumen bzw. in die Galle [4, 5]. ABC-Transporter können ihre Substrate nur in eine Richtung transportieren [9].

Bei einer Fehlfunktion der Transporter kann es zu einer sehr seltenen Erkrankung, der Sitosterinämie kommen [12]. Sie ist eine autosomal rezessive Krankheit, bei der eine Mutation im ABCG5- bzw. im ABCG8-Gen vorliegt [4, 5]. Dies hat zur Folge, dass Cholesterin, pflanzliche Sterine und Stanole in hohen Konzentrationen vom Darm resorbiert werden und nur vermindert über die Galle ausgeschieden werden. Die Sterine und Stanole reichern sich sowohl im Plasma als auch im Gewebe an. Klinisch zeigt sich die Sitosterinämie mit Xanthomen, Arteriosklerose, Arthritis und koronarer Herzkrankheit, selbst Jugendliche erleiden Herzinfarkte [13-15].

ABCG5/G8 Transporter sind die wichtigsten Transporter für Sterine von der Leber in die Galle. Sie werden vom liver x receptor (LXR) reguliert [4, 16]. LXR reguliert viele am Fettstoffwechsel beteiligte Gene. Er bindet an den Promoter und kann so die Genexpression induzieren. Bei Gabe von LXR-Agonisten kommt es zur vermehrten Expression von ABCG5 und ABCG8 [16, 17]. Endogene Liganden von LXR sind Oxysterine, aber wahrscheinlich auch pflanzliche Sterine, die somit einen Cholesterin und pflanzliche Sterine reduzierenden Effekt ausüben können [18].

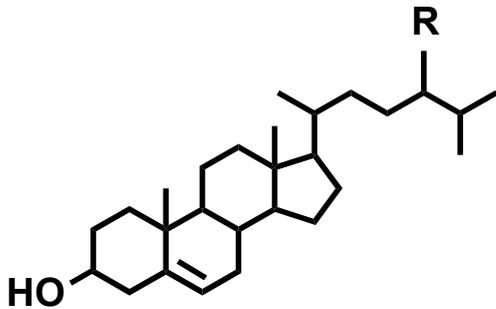
1.5 Sterine und Stanole

Als Sterine werden alle Verbindungen bezeichnet, die ein perhydriertes 1,2-Cyclopentanophenanthren-Gerüst besitzen. Das Grundgerüst besteht aus drei Cyclohexan-Ringen und einem Cyclopentan-Ring. Am Kohlenstoffatom C₁₀ und C₁₃ befindet sich je eine Methylgruppe und am C₁₇ ein 1,5-Dimethylhexylrest. C₃ trägt eine Hydroxylgruppe.

Als Stanole oder gesättigte Sterine bezeichnet man die Struktur, wenn keine Doppelbindung im Ringsystem vorhanden ist, hat das Ringsystem eine Doppelbindung spricht man von Sterinen. Die einzelnen Sterine unterscheiden sich untereinander durch weitere Alkylreste an der Seitenkette von C₁₇ und weiteren Doppelbindungen. Durch Sättigung der Doppelbindung an der delta 5-Position entstehen 5 α -Stanole.

Die in dieser Studie untersuchten Strukturen waren zum einen das in tierischen Zellen synthetisierte Cholesterin und seine 5 α -gesättigte Form, das Cholestanol. Zum anderen wurden pflanzliche Sterine und Stanole untersucht. Dies waren Sitosterin und Campesterin und ihre 5 α -gesättigten Formen Sitostanol und Campestanol (Abbildung 1).

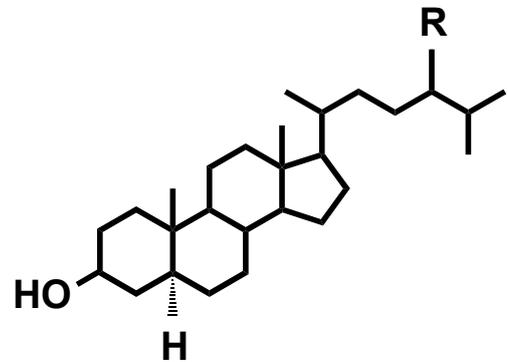
Abbildung 1: Grundgerüst der Sterine und Stanole



R = H; Cholesterin

R = CH₃; Campesterin

R = C₂H₅; Sitosterin



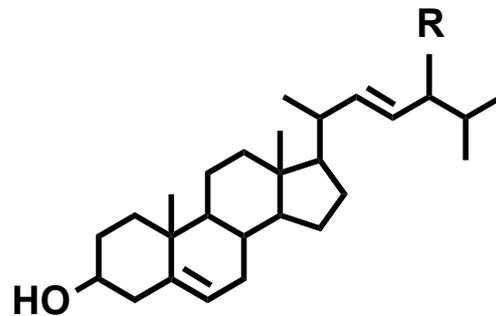
R = H; 5 α -Cholestanol

R = CH₃; 5 α -Campestanol

R = C₂H₅; 5 α -Sitostanol

Stigmasterin und Brassicasterin wurden ebenfalls analysiert, sie weisen eine zusätzliche Doppelbindung in der Seitenkette auf und unterscheiden sich durch eine Ethyl- bzw. Methylgruppe (Abbildung 2).

Abbildung 2: Grundgerüst der 2-fach ungesättigten Sterine



R = CH₃; Brassicasterin

R = C₂H₅; Stigmasterin

1.6 Vorkommen und Resorption von Sterinen und Stanolen

Cholesterin ist in jeder tierischen Zelle enthalten. Die Cholesterinresorption im Darm beträgt 20-80% [19-22]. Im Gegensatz dazu werden pflanzliche Sterine und Stanole nur zu einem geringen Teil aufgenommen [21]. Pflanzliche Sterine kommen vor allem in pflanzlichen Ölen und Nüssen, sowie in Obst und Gemüse vor. Sitosterin und Campesterin haben den größten Anteil der pflanzlichen Sterine in der Nahrung [22, 23]. Sitosterin hat eine Resorptionsrate zwischen 4% und 7%, bei Campesterin liegt diese zwischen 6% und 16% [19-22]. Der Stigmasterinanteil an der Nahrung ist wesentlich geringer und die Resorptionsrate liegt im Mittel bei 5%.

Pflanzliche Stanole sind in der Nahrung nur in Spuren enthalten [24]. Sitostanol wird zu weniger als 1% absorbiert [21], im Gegensatz dazu hat Campestanol eine Resorptionsrate von 12.5% [19]. Die Konzentrationen der pflanzlichen Stanole im Blut können durch die geringe Resorptionsrate und die eventuelle endogene Umwandlung von Sitosterin, Stigmasterin und Campesterin zu ihren delta 5 α - gesättigten Metaboliten (Sitostanol und Campestanol) erklärt werden [25]. Cholestanol wird endogen aus Cholesterin gebildet, es ist nur zu einem kleinen Teil in der Nahrung vorhanden.

1.7 Funktion von Cholesterin, pflanzlichen Sterinen und Stanolen

Cholesterin hat verschiedene wichtige Funktionen im Organismus. In der Leber wird Cholesterin zu Gallensäuren metabolisiert. Diese werden in der Gallenblase gespeichert und bei Nahrungsaufnahme ins Duodenum abgegeben. Die Gallensäuren sind zum einen das Hauptabbauprodukt des Cholesterins und zum anderen fördern sie die Hydrolyse der Nahrungslipide und erleichtern dadurch die Lipidresorption im Dünndarm.

Cholesterin kommt als Strukturelement in allen Biomenbranen vor. Eine erhöhte Cholesterinkonzentration beeinträchtigt die Fluidität von Zellmembranen. Sind die Zellen des strömenden Blutes betroffen, werden diese anfällig gegenüber osmotischen Veränderungen und gegenüber Scherkräften. Die Lebensdauer dieser Zellen sinkt. Die veränderte Lipidzusammensetzung von Membranen kann sowohl die Signaltransduktionsprozesse als auch die Aktivität membranständiger Enzymsysteme beeinträchtigen.

Cholesterin wird als Vorstufe der Steroidhormone benötigt. Von ihm leiten sich Gestagene, Glukokortikoide, Mineralokortikoide, Androgene und Östrogene ab. Des Weiteren ist Cholesterin die Vorstufe des Vitamin D. Dieses Vitamin spielt bei der Kontrolle des Calcium- und Phosphathaushalts eine wichtige Rolle. Bei Vitamin D Mangel entsteht Rachitis.

Cholesterin kann außerdem mit Hilfe der ACAT (Acyl-CoA-Cholesterylacetyl-Transferase) verestert werden und somit in eine Speicherform überführt werden.

Eine Hypercholesterinämie ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung einer Arteriosklerose.

Pflanzliche Sterine werden von Pflanzen und Pilzen gebildet. Sie werden analog zum Cholesterin in pflanzliche Biomembranen eingebaut und sind für die Struktur und Erhalt der Membranen wichtig. Pflanzliche Sterine dienen als Vorstufe zur Synthese von Phytosteroidhormonen, diese regulieren z. B. den Wachstumsprozess von Pflanzen. Sitosterin ist mehrheitlich als Baustein der Biomembranen zu finden. Campesterin stellt eine der wichtigsten Vorstufen für die Synthese der Phytosteroide dar. Über die Funktion von pflanzlichen Sterinen und Stanolen im Körper des Menschen ist noch nicht viel bekannt. Fest steht, dass die orale Verabreichung von pflanzlichen Sterinen/Stanolen einen reduzierenden Effekt auf die Cholesterinresorption hat und deswegen zu einer Senkung des Serumcholesterins führt. Sitosterin und Sitostanol verringern die Cholesterinresorption im Darm, wobei die Hemmung der Cholesterinresorption durch Sitostanol stärker ist als die durch Sitosterin [19].

Nachgewiesen wurde, dass Phytosterole nicht in die Biomembran von Säugetierzellen eingebaut werden können [16]. Auch können sie beim Menschen nicht in Gallensäuren umgewandelt werden [26].

1.8 Die Leber und ausgewählte Lebererkrankungen

Die Leber ist mit durchschnittlich 1500 g die größte Drüse des menschlichen Körpers. Täglich wird etwa ein Liter Gallenflüssigkeit von den Leberzellen produziert. Diese beinhaltet Gallensäuren, Gallenfarbstoffe, Cholesterin, Lecithin und Mineralien. Die Leberzellen geben die Galle in die Gallenkapillaren ab. Die Gallenkapillaren münden über Heringer-Kanäle in die Ductuli interlobulares. Von dort gelangt die Galle in die Ductuli biliferi, die schließlich in den Ductus hepaticus dexter bzw. sinister münden. Ductus hepaticus sinister und dexter vereinigen sich zum Ductus hepaticus communis. Zusammen mit dem, von der Gallenblase kommenden, Ductus cysticus vereinigt er sich zum Ductus choledochus. Dieser mündet in das Duodenum. Zwischen den Verdauungsperioden gelangt die Galle retrograd über den Ductus cysticus in die Gallenblase. Bei der Verdauung wird sie dann durch Kontraktion entleert und die Gallenflüssigkeit fließt in den Darm ab.

Die Leber bildet aber nicht nur Galle, sondern ist auch am Protein-, Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel beteiligt. Sie synthetisiert Cholesterin und bildet Gerinnungsfaktoren. Außerdem ist sie für die Entgiftung und Ausscheidung toxischer Stoffe verantwortlich.

Lebererkrankungen können das Gleichgewicht des hepatischen Stoffwechsels stören.

Ein Klatskintumor, an dem drei der untersuchten Patienten erkrankt waren (Tabelle 2), ist ein Karzinom der Gallengänge mit Sitz an der Gabelung des Ductus hepaticus. Mit zunehmender Größe verdrängt der Tumor die Leberzellen und schränkt sie in ihrer Funktion ein. Durch das Verlegen der abführenden Gallengänge kommt es zur Cholestase.

Bei einem weiteren Patient bestand ein hepatozelluläres Karzinom sowie eine Leberzirrhose. Das Karzinom zerstört die Leber und verändert ihre Funktionsfähigkeit. Die Leberzirrhose führt zu einer Fibrosierung der Leberläppchen, die Läppchenstruktur wird zerstört. Es kommt zur Leberinsuffizienz.

Auch bei den beiden übrigen Patienten kam es zur Cholestase, bei einem durch Gallengangssteine, beim anderen durch eine Echinokokkenzyste, die den Ductus hepaticus communis verlegten.

Die Leberschädigung spiegelte sich in den Laborwerten wie zum Beispiel einer erhöhten alkalischen Phosphatase und γ -Glutamyl-Transferase wider. Im Rahmen dieser Studie wurde die alkalische Phosphatase als Maß der Cholestase angesehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Bei der Aufarbeitung der Proben und Auswertung der Ergebnisse wurden nachstehende Materialien verwendet.

2.1.1 Chemikalien

5 α -Cholestan	1 mg 5 α -Cholestan (Serva Electrophoresis Heidelberg) gelöst in 1 ml Cyclohexan
BHT-Lösung	10 mg BHT (2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol) (Merck, Darmstadt) gelöst in 50 ml Methanol p.a. (Merck, Darmstadt)
Cyclohexan	Merck, Darmstadt
n-Dekan	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Epikoprostanol	100 μ g 5 β -Cholestan-3 α -ol (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) gelöst in 1 ml Cyclohexan
1 N NaOH in 90% Ethanol	8 g Natriumhydroxid, gelöst in 20 g Aqua dest. und 180 ml Ethanol
Silylierungsreagenz	50 ml Trimethylchlorsilan (Merck, Darmstadt) 150 ml 1,1,1,3,3,3 Hexamethyldisilazan (Merck, Darmstadt) 450 ml Pyridin (Merck, Darmstadt)

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterial

Combitips plus	Eppendorf, Hamburg
DB-XLB Kapillarsäule	J&W, Folsom, USA
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorfpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg

GC HP 6890	Hewlett Packard, Waldbronn
GC/MS HP 5972	Hewlett Packard, Waldbronn
Mikro-Insert	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH, Wertheim
Plastikröhrchen mit Deckel	Greiner Bio-one
Sekretbeutel-Universal	Everhards, Meckenheim
Schüttelwasserbad	GFL 1086, Köttermann, Labortechnik
Vial mit Deckel	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Vortex - Schüttler	REAX 2000, Heidolph
Waage	Waagen Prümm, Köln
Zentrifuge Heraeus Sepatech	Kendro, Laboratory Products

2.2 Patienten

2.2.1 Probengewinnung

Im Rahmen dieser Studie wurden von sechs Patienten Gallen- und Blutproben entnommen. Bei allen Patienten erfolgte im Vorfeld aufgrund ihrer Erkrankung die Anlage einer nasobiliären Sonde. Diese Sonde lag in einem der abführenden Gallengänge. Nach Aufklärung der Patienten und deren schriftlichem Einverständnis wurde die Probengewinnung, morgens nach einer nächtlichen Fastenperiode, über sechs Stunden durchgeführt. Die abfließende Galle wurde in einem stündlich gewechselten Beutel quantitativ gesammelt. Halbstündlich versetzt zum Wechsel des Gallenbeutels wurde eine venöse Blutprobe entnommen. Es ergaben sich somit für jeden Patienten sechs Gallen- und sechs Blutproben. Vor der weiteren Behandlung der Proben erfolgte die Bestimmung des Volumens der einzelnen Gallenproben. Das Blut wurde zentrifugiert, so dass mit dem Serum weitergearbeitet werden konnte.

Die gewonnenen Proben wurden mit 10 µl BHT pro Milliliter Probe gemischt. BHT ist ein Antioxidans, das die autoxidative Umwandlung von Cholesterin in den Proben verhindert. Danach wurden die Proben bis zur Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.3 Methoden

2.3.1 Aufarbeitung der Proben

Nach dem Auftauen der Proben wurden diese durch alkalische Hydrolyse, Extraktion und Derivatisierung für die gaschromatographische Analyse vorbereitet. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte in folgenden Schritten.

- Pipettierung von 50 μl 5 α -Cholestan- und 10 μl Epikoprostanol-Lsg. in ein Zentrifugenröhrchen. Diese Zusatzstoffe dienen als interner Standard. Zufügen von 200 μl des Serums zur Aufarbeitung der Serumproben bzw. 100 μl der Galle wegen der zu erwartenden höheren Konzentration der Sterine und Stanole bei den Gallenproben.
- Zugabe von 1 ml 1N NaOH in die Röhrchen zur alkalischen Hydrolyse. Nach festem Verschließen der Röhrchen mit einem Schraubdeckel erfolgte die Inkubation im Wasserbad für 1 Stunde bei 67 °C. Durch dieses Vorgehen werden Proteine denaturiert, vorhandene Esterbindungen hydrolysiert und die proteingebundenen Lipide werden freigesetzt.
- Zur Extraktion werden 0,5 ml Aqua dest. und 3 ml Cyclohexan in die Zentrifugenröhrchen hinzugefügt. Schütteln der Proben für 30 sec, danach erfolgt Zentrifugation für 10 min bei 3500 Umdrehungen/min. Dabei tritt eine Phasentrennung auf. Nach Überführung der oberen hydrophoben Phase in ein separates Röhrchen wird der Extraktionsschritt wiederholt.
- Verdampfung der vereinigten Cyclohexanphasen unter N₂-Strom bei 65 °C, Aufnahme des Rückstandes in 160 μl n-Dekan.
 - Überführung von 80 μl in ein Vial mit Mikro-Insert. Diese Probe war zur Messung am GC/MS bestimmt
 - Pipettierung der restlichen 80 μl in ein Vial und zufügen von 400 μl n-Dekan, diese Probe war für die Messung am GC bestimmt
- Zugabe von Silylierungsreagenz zu den Proben zur Derivatisierung
 - 20 μl TMS-Reagenz bei den Proben, die am GC/MS gemessen werden sollten
 - 40 μl TMS-Reagenz bei den Proben, die am GC gemessen werden sollten

- Verschließen der Vials und Inkubation für 1 Stunde bei 70 °C auf der Heizplatte. Das TMS-Reagenz reagiert mit der bei der alkalischen Hydrolyse freigesetzten Hydroxylgruppe der Sterine und Stanole zu Sterin- bzw. Stanol-Trimethylsilyether.

2.3.2 Gaschromatographisch-massenspektroskopische Analysen

Die so aufgearbeiteten Proben wurden anschließend in einem Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer analysiert. Die Gaschromatographie ist eine Trennmethode, bei der eine Substanzmischung mit Hilfe eines Trägergases über eine stationäre Phase geleitet wird. Das Gemisch wird während dieses Vorganges in seine Bestandteile getrennt. Die Wechselwirkung der zu analysierenden Substanzen mit der stationären Phase ist temperaturabhängig. Das Retentionsverhalten der Analytkomponenten kann durch Temperaturveränderungen variiert werden. Die Auftrennung eines Stoffgemisches erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte der Einzelkomponenten. Die Substanzen werden durch das Trägergas in die Trennsäule transportiert, die im GC-Ofen eingebaut ist. In dieser Trennsäule wird durch kontrollierte Temperaturerhöhung die Auftrennung eines Stoffgemisches in seine einzelnen Substanzen erreicht. Am Ende der Säule befindet sich der Detektor, der ein elektrisches Signal an ein Computersystem übermittelt, sobald eine Substanz die Säule verlässt. Das Signal wird im Chromatogramm registriert und als Peak aufgezeichnet. Bei der gekoppelten GC/MS werden die Substanzen nach der Trennung durch den Gaschromatographen massenspektrometrisch analysiert. Die GC/MS ermöglicht eine sichere Identifizierung der einzelnen Stoffe und hat eine hohe Empfindlichkeit in der Bestimmung von geringen Mengen eines Stoffes. Die massensensitiven Detektoren decken nur einen begrenzten Massenbereich bis ca. 1000 Da ab. Cholesterin wurde nicht am GC/MS analysiert, sondern nur gaschromatographisch bestimmt, da zu erwarten war, dass es in den Proben in großer Menge vorkommt und dadurch auch mit Hilfe der GC gut zu identifizieren und zu quantifizieren war.

Die GC/MS-Analyse erfolgte an einem Gerät der Firma Hewlett Packard (HP 5890). Es wurde eine DB-XLB Kapillarsäule von 30 m Länge und einem Durchmesser von 0.25 mm verwendet. Die Innenseite der Kapillarsäule war mit einem Methylsiliconfilm von 0.25 µm Dicke ausgekleidet. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Flussrate des Heliums betrug 1 ml/min. Der Initialdruck betrug 3.0 psi, dieser erhöhte sich bis zu einem Enddruck von 13.4 psi. Das Temperaturprogramm begann mit einer Ausgangstemperatur von 150 °C, nach

1 min stieg die Temperatur in Schritten von 30 °C/min auf die Endtemperatur von 290 °C an, letztere blieb über 30 min konstant.

2.3.3 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wurde vom Institut für klinische Biochemie der Universität Bonn mit Hilfe der Flex Reagenzkassette für alkalische Phosphatase, der Firma Dade Behring, bestimmt. Das Verfahren beruht auf der Erkenntnis, dass die alkalische Phosphatase die Transphosphorylierung von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol in Gegenwart von 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol katalysiert. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist direkt proportional zur Änderung der Extinktion bei 405 nm durch die Bildung von p-Nitrophenol. Dies kann biochromatisch als kinetische Reaktion gemessen werden.

2.4 Auswertung

2.4.1 Berechnung der Konzentrationen

Die einzelnen Komponenten der Substanzmischung wurden durch elektronische Signalgebung des Detektors vom Computer als Peak registriert. Anhand der Retentionszeit kann eine Substanz meist identifiziert werden, zusätzlich dazu wird sie an ihrem Massenspektrum charakterisiert. Die Retentionszeit ist die Zeit, die eine Substanz vom Zeitpunkt der Einspritzung der Probe bis zum Passieren des Detektors benötigt. Nach der Peakflächen-Integration wurden die sich daraus ergebenden Werte in Relation zur Fläche eines internen Standards gesetzt. Als interner Standard fand bei der Cholesterinauswertung 5 α -Cholestan und bei den übrigen Sterinen und Stanolen Epikoprostanol Verwendung. Die endgültige Quantifizierung wurde anhand von Eichgeraden vorgenommen. Die Eichgeraden wurden bei jeder Serie durch Messen von Kalibrationslösungen, die die zu untersuchenden Substanzen in bekannten Konzentrationen enthielten, ermittelt.

Die spezifischen Massen für die Substanzen, angegeben in Masse pro Ladungseinheit (m/z), und die Retentionszeiten für die einzelnen Stoffe, waren folgende: Epikoprostanol

370 m/z, 17.78 min; Cholestanol 306 m/z, 20.40 min; Campesterin 472 m/z, 22.48 min; Campestanol 474 m/z, 22.93 min; Stigmasterin 484 m/z, 23.15 min; Sitosterin 486 m/z, 25.17 min; Sitostanol 488 m/z, 25.74 min; Brassicasterin 470 m/z, 20.78 min. Cholesterin wurde am GC analysiert.

2.4.2 Berechnung der Clearance

Mit Hilfe der Clearance kann man eine Aussage über das pro Zeiteinheit von einer Substanz gereinigte Plasmavolumen machen. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$Cl = \frac{\text{Konz. des Stoffes in der Galle [mg/dl]} \times \text{Gallenvolumen/h [ml/h]}}{\text{Konz. des Stoffes im Plasma [mg/dl]}}$$

2.5 Statistik

Aus den gewonnenen Daten wurden die Mittelwerte berechnet und als Mittelwert \pm SD bzw. \pm SEM angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ungepaarten T-Testes, dazu wurden die Computerprogramme SPSS und Excel verwendet. Werte ≤ 0.05 wurden als signifikant angesehen.

Der T-Test für unverbundene Stichproben konnte auch an dieser sehr kleinen Stichprobe durchgeführt werden, da die Daten der Stichprobe mit Daten einer Stichprobe von gesunden Probanden verglichen wurden. Die Analyse der Daten zeigte, dass die Annahme einer Normalverteilung der beiden Grundgesamtheiten nicht verletzt wurde, so dass ein statistischer Vergleich der Mittelwerte der beiden Stichproben mit einem heteroskedastischen T-Test für unverbundene Stichproben möglich war.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten zu den Patienten sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst. In die Studie eingeschlossen waren drei Männer und drei Frauen. Das mittlere Alter lag bei 63 ± 16.8 Jahren. Tabelle 2 zeigt, dass zwei Patienten aufgrund einer Infektion therapiert wurden, die anderen vier Patienten waren wegen einer Tumorerkrankung in Behandlung. Drei Patienten nahmen während der Studie Medikamente ein, die einen nachweislichen Effekt auf den Sterinmetabolismus haben. Patient 1 erhielt eine Infusion mit Lipiden. Bei Patient 2 war die Einnahme von Ursodesoxycholsäure (500 mg/Tag) und bei Patient 3 die Einnahme von Ursodesoxycholsäure (750 mg/Tag) und Atorvastatin (20 mg/Tag) bekannt.

Tabelle 1: Klinische Daten der Patienten

Patient	Alter	Geschlecht	Gewicht	BMI	Anzahl der Tage nach Einlage der Sonde
	Jahre		kg	kg/m ²	
1	61	weiblich	63	25.2	4
2	32	weiblich	64	27.3	2
3	82	männlich	81	27.4	3
4	71	männlich	79	27.7	2
5	66	weiblich	72	26.5	5
6	67	männlich	57	22.6	20
MW \pm SD	63 ± 16.8		69 ± 9.6	26.1 ± 2.0	

Tabelle 2:

Diagnosen und Medikamente der Patienten

Patient	Diagnosen	Medikamente
1	Klatskintumor, Cholangitis, Stenose des Stents	Dimenhydrinat, Pantoprazol, Furosemid, Piperacillin/Tazobactam, Saline 0.9%, Infusionen mit Aminosäuren, Glukose, Vitaminen und Spurenelementen, Infusion mit Lipiden (Lipovenös 20%), Insulin, Clonidin
2	Choledocholithiasis bei Zustand nach Cholezystektomie, Cholangitis	Ursodesoxycholsäure 500 mg/Tag, Clotrimazol, Sultamicillintosilat
3	Echinokokkeninfektion der Leber mit Stenose des Ductus hepaticus communis, Cholezystolithiasis, Stent im Ductus hepaticus communis	Ursodesoxycholsäure 750 mg/Tag, Atorvastatin 20 mg/Tag, Pantoprazol, Sultamicillintosilat, Metoprolol, Acetylsalicylsäure, Tamsulosin, Ramipril, Molsidomin, Isosorbiddinitrat, Albendazol
4	Klatskintumor, Cholezystektomie, Cholangitis, Cholestase, Stent im Ductus choledochus	Levothyroxin, Pantoprazol, Kaliumjodid, Ciprofloxacin, Metoclopramid, Phytomenadion
5	Klatskintumor, Cholezystolithiasis, cholestatischer Ikterus mit Cholangitis, Stent im Ductus choledochus	Moxonidin, Pantoprazol, Sertralin, Hydrochlorothiazid, Lorazepam, Enalapril, Carvedilol
6	Zustand nach atypischer Leberresektion von Segment 3, biliäre Fistel, hepatozelluläres Karzinom, Leberzirrhose Child A	Lisinopril, Pantoprazol, Kaliumjodid

3.2 Serumkonzentrationen

Die Mittelwerte der Serumkonzentration von Cholesterin, Cholestanol, den pflanzlichen Sterinen und Stanolen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Plasmakonzentration von Cholesterin lag zwischen 102 und 316 mg/dl bei einem Mittelwert von 196 ± 30.8 mg/dl (Mittelwert \pm SEM). Die Konzentration der pflanzlichen Sterine war bis zu 10.000 mal niedriger als die von Cholesterin und die Konzentration der pflanzlichen Stanole war sogar 25.000 mal niedriger. Bei vier der Patienten lag die Campesterinkonzentration höher als die von Sitosterin, umgekehrt war die Situation bei den Patienten 1 und 3, dort war die Sitosterinkonzentration höher als die Campesterinkonzentration. Deshalb gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden pflanzlichen Sterinen. Die Campestanolkonzentration war, bis auf Patient 4, niedriger als die Serumkonzentration von Sitostanol ($p = 0.04$).

Tabelle 3:
Serumkonzentrationen von Cholesterin, Cholestanol, Campesterin, Sitosterin, pflanzlichen Sterinen und Stanolen bei Patienten mit nasobiliärer Sonde

Patient	Cholesterin	Cholestanol	Campesterin	Sitosterin	Stigmasterin	Brassicasterin	Campestanol	Sitostanol
	mg/dl (n = 6; MW ± SD)				µg/dl (n = 6; MW ± SD)			
1	316±12.1	0.77±0.09	0.64±0.06	0.83±0.09	108.0±14.0	31.3±2.26	17.1±2.04	20.3±2.01
2	221±14.0	0.18±0.01	0.27±0.01	0.22±0.03	9.5± 4.92	22.4±0.80	2.3±0.17	3.5±0.38
3	102±10.6	0.29±0.01	0.36±0.02	0.45±0.03	15.5± 1.09	17.7±1.03	4.7±0.18	6.6±0.48
4	178±13.8	0.57±0.04	0.23±0.02	0.21±0.02	8.1± 0.87	16.9±0.77	6.2±0.42	5.9±0.69
5	221±10.7	0.46±0.02	0.31±0.01	0.29±0.01	11.6± 0.59	19.5±0.62	5.7±0.28	7.1±0.41
6	135±9.1	0.27±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	3.9± 0.91	8.0±0.13	2.4±0.24	3.1±0.12
MW± SEM	196±30.8	0.42±0.09	0.31±0.08	0.34±0.11	26.1± 16.5	19.3±3.1	6.4±2.25	7.7±2.60

3.3 Gallekonzentrationen

Wie erwartet zeigte Cholesterin auch in der Galle die höchste Konzentration der untersuchten Sterine/Stanole (76.4 ± 34.2 mg/dl) (Tabelle 4). Sitosterin hatte die höchste Konzentration, der pflanzlichen Sterine in der Galle, aber der Unterschied zu Campesterin war nicht signifikant ($p = 0.107$). Die Konzentration von Sitostanol war im Vergleich zu der von Campestanol bei fünf Patienten höher, nur bei Patient 6 war die Situation umgekehrt. Patient 2 hatte, trotz der Einnahme von Ursodeoxycholsäure, die höchste Cholesterinkonzentration in der Galle. Patient 4 wies für alle gemessenen Werte die niedrigsten Konzentrationen auf. Patient 1 hatte für Stigmasterin, Sitostanol und Campestanol Gallenkonzentrationen, die bis zum 3-fachen des Mittelwertes betragen.

Tabelle 4:
Gallenkonzentrationen von Cholesterin, Cholestanol, pflanzlichen Sterinen und Stanolen bei Patienten mit nasobiliärer Sonde

Patient	Cholesterin	Cholestanol	Campesterin	Sitosterin	Stigmasterin	Brassicasterin	Campestanol	Sitostanol
	mg/dl (n = 6; MW ± SD)				µg/dl (n = 6; MW ± SD)			
1	54.6 ± 19.8	1.29 ± 0.53	0.49 ± 0.20	0.96 ± 0.40	375.8 ± 168.5	50.4 ± 17.0	102.6 ± 46.5	122 ± 55.2
2	237 ± 28.2	1.27 ± 0.14	1.24 ± 0.18	1.24 ± 0.15	172.8 ± 21.8	208.1 ± 29.2	39.3 ± 5.17	41.4 ± 6.37
3	17.6 ± 2.59	0.32 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.48 ± 0.06	47.3 ± 7.25	29.6 ± 3.02	22.7 ± 4.04	27.6 ± 5.41
4	4.73 ± 1.59	0.12 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	5.79 ± 0.40	8.36 ± 0.42	5.94 ± 1.50	5.87 ± 2.19
5	66.3 ± 18.9	0.77 ± 0.22	0.31 ± 0.09	0.37 ± 0.10	30.3 ± 7.62	39.4 ± 8.66	15.7 ± 5.00	17.9 ± 5.31
6	78.0 ± 2.92	0.96 ± 0.06	0.15 ± 0.01	0.21 ± 0.02	12.4 ± 1.30	21.4 ± 0.63	10.1 ± 1.65	9.42 ± 0.51
MW ± SEM	76.4 ± 34.21	0.79 ± 0.20	0.41 ± 0.18	0.55 ± 0.19	107.4 ± 59.2	59.5 ± 30.3	32.7 ± 14.8	37.4 ± 17.7

3.4 Clearance

Wie in Tabelle 5 dargestellt, hatte Cholesterin bei allen Patienten die niedrigste Clearance der untersuchten Stoffe ($p < 0.02$ oder kleiner). Die Sitosterin-clearance war bei allen sechs Patienten höher als die von Campesterin. Erwartungsgemäß zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation der hepatischen Clearance zwischen diesen beiden pflanzlichen Sterinen ($p = 0.0005$) (Abbildung 3). Stigmasterin hatte die höchste Clearance unter den Sterinen. Die Stanole Campestanol und Sitostanol hatten ungefähr die gleichen Clearancewerte. Im Vergleich dazu war die Cholestanolclearance wesentlich geringer.

Die Cholesterin-clearance zeigte, sowohl zur Sitosterin-, als auch zur Campesterin-clearance eine hohe Korrelation (Sitosterin $r = 0.940$, $p < 0.01$ und Campesterin $r = 0.956$, $p < 0.01$).

Abbildung 3: Korrelation zwischen Campesterin- und Sitosterin-clearance

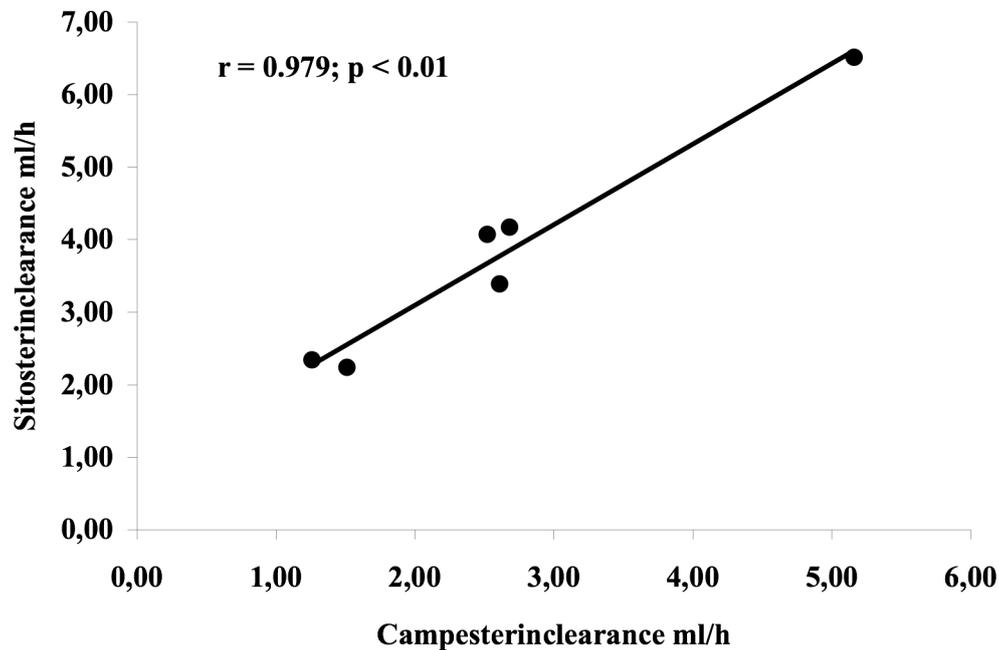


Tabelle 5:
Hepatische Clearance von Cholesterin, Cholestanol, Campesterin, Sitosterin und Stigmasterin bei Patienten mit nasobiliärer Sonde

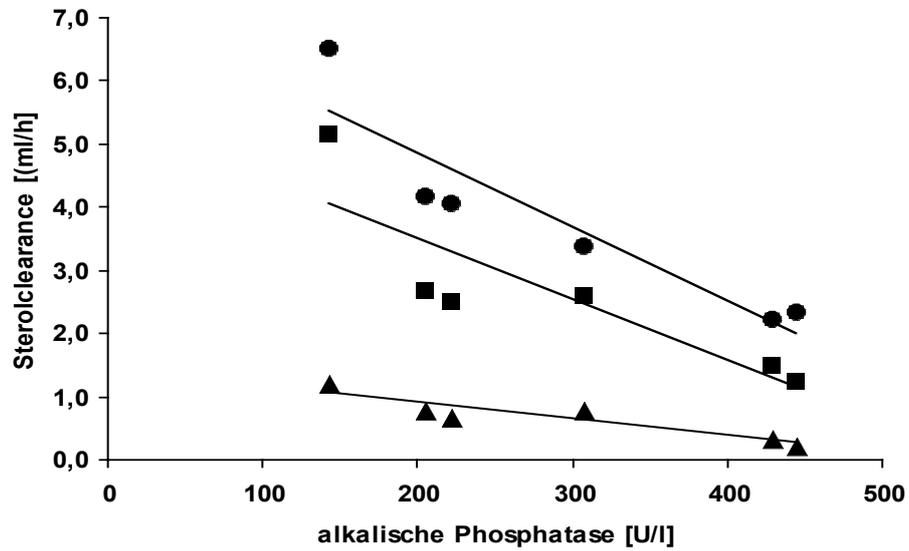
Patient	Cholesterin	Cholestanol	Campesterin	Sitosterin	Stigmasterin	Brassicasterin	Campestanol	Sitostanol
	ml/h (n = 6; MW \pm SD)							
1	0.34 \pm 0.2	3.27 \pm 1.9	1.51 \pm 0.8	2.24 \pm 1.3	6.92 \pm 4.5	3.13 \pm 1.7	11.8 \pm 7.2	11.6 \pm 6.9
2	1.21 \pm 0.2	7.82 \pm 1.2	5.16 \pm 1.0	6.51 \pm 1.4	23.7 \pm 8.7	10.51 \pm 2.0	19.5 \pm 3.9	13.4 \pm 3.3
3	0.67 \pm 0.2	4.23 \pm 0.5	2.52 \pm 0.4	4.07 \pm 0.6	11.7 \pm 2.2	6.37 \pm 1.0	18.2 \pm 3.1	16.1 \pm 3.5
4	0.22 \pm 0.1	1.75 \pm 0.4	1.26 \pm 0.2	2.34 \pm 0.4	6.01 \pm 0.7	4.11 \pm 0.3	7.86 \pm 1.7	8.34 \pm 2.9
5	0.80 \pm 0.3	4.44 \pm 1.2	2.61 \pm 0.8	3.39 \pm 1.0	6.88 \pm 1.7	5.33 \pm 1.3	7.24 \pm 2.1	6.62 \pm 1.7
6	0.80 \pm 0.2	4.85 \pm 1.1	2.68 \pm 0.6	4.17 \pm 1.0	4.49 \pm 1.2	3.67 \pm 0.7	5.84 \pm 1.6	4.18 \pm 0.9
MW \pm SEM	0.67 \pm 0.2	4.39 \pm 0.8	2.62 \pm 0.6	3.79 \pm 0.6	9.95 \pm 2.9	5.52 \pm 1.1	11.7 \pm 2.4	10.0 \pm 1.8

In Tabelle 6 sind die Werte der alkalischen Phosphatase zum Zeitpunkt der Untersuchung dargestellt. Alle Patienten wiesen aufgrund ihrer jeweiligen Leberschädigung eine oberhalb des Normbereichs liegende alkalische Phosphatase auf. Abbildung 4 verdeutlicht die negative Korrelation zwischen der alkalischen Phosphatase und der Clearance von Cholesterin und den pflanzlichen Sterinen Sitosterin und Campesterin. Je höher die alkalische Phosphatase war, umso geringer war die hepatische Clearance. Dies traf nicht für die Clearance der Stanole Sitostanol und Campestanol zu.

Tabelle 6: Alkalische Phosphatase zum Zeitpunkt der Untersuchung (Normbereich 34 - 131 U/l)

Patient	Alkalische Phosphatase U/l
1	429
2	142
3	222
4	444
5	307
6	205

Abbildung 4: Korrelation der Clearance von Cholesterin, Sitosterin und Campesterin zur alkalischen Phosphatase (Cholesterin = ▲ ($r = -0.921$, $p < 0.01$), Sitosterin = ● ($r = -0.924$, $p < 0.01$); Campesterin = ■ ($r = -0.0861$, $p < 0.03$)).



4. Diskussion

In dieser Studie wurde zum ersten Mal die Leberclearance für Cholesterin, Cholestanol, Sitosterin, Campesterin, Stigmasterin, Brassicasterin, Sitostanol und Campestanol bei Patienten mit Lebererkrankungen untersucht.

Es zeigte sich, dass die Leberclearance bei den Patienten mit Lebererkrankung deutlich niedriger war als im Vergleich zu gesunden Probanden [1]. Die Cholestase führt zur verminderten Elimination von Stoffen, die über die Leber verstoffwechselt werden, und damit zur Anreicherung im Körper. Die Clearance der einzelnen Stoffe war sehr unterschiedlich. Ein Vergleich konnte nur für Cholesterin, Sitosterin und Campesterin angestellt werden, da die anderen Sterine und Stanole bei gesunden Probanden nicht untersucht worden waren. Festgestellt wurde, dass die Cholesterinclearance von gesunden Probanden um das 4-fache höher lag, als bei Patienten mit Lebererkrankungen. Die Clearance von Campesterin war 8-mal höher bei Gesunden und die von Sitosterin war sogar 13-mal stärker als bei den hier untersuchten Patienten. Das Verhältnis der Campesterinclearance zur Cholesterinclearance war bei beiden Patientenkollektiven ungefähr gleich. Das Verhältnis der Sitosterinclearance zur Cholesterinclearance und das Verhältnis der beiden pflanzlichen Sterine zueinander war bei gesunden Probanden ungefähr doppelt so groß wie bei den Patienten mit Lebererkrankungen. Dies ist durch die viel höhere Sitosterinclearance der Gesunden zu erklären. Die Lebererkrankungen der Patienten verminderte die Clearance von Cholesterin, Sitosterin und Campesterin im Vergleich zu gesunden Probanden erheblich.

Die verwendete Methode zur Ermittlung der Sterin- und Stanolkonzentration im Serum und in der Galle geht auf eine von Grundy und Ahrens [27] beschriebene Methode zurück. Sie hatten damals mehrere Methoden miteinander verglichen. Die benutzte gaschromatographische/massenspektrometrische Analyse hat den Vorzug, dass sie eine quantitative Messung von Sterinen und Stanolen erlaubt, ohne dass die Probanden radioaktiv markierte Isotope einnehmen müssen. Dies minimiert die Belastung für die Patienten. Die Aufarbeitung der Proben wurde durch das Labor in einigen Punkten modifiziert. Sudhop et al. [1] verwendeten die gleiche Methode, dies ermöglichte den Vergleich der Daten beider Studien.

Sudhop et al. [1] ermittelten die Clearance für Sitosterin, Campesterin und Cholesterin bei gesunden Probanden. Die Clearance bei den hier ausgewählten Patienten war wesentlich niedriger als bei Gesunden. Die Serumkonzentrationen von Cholesterin, Sitosterin und

Campesterin waren in beiden untersuchten Patientenkollektiven annähernd gleich. Dies deutet darauf hin, dass die Lebererkrankung der Patienten die Clearance negativ beeinflusst. Die erhöhte alkalische Phosphatase als Zeichen der Cholestase hat eine negative Korrelation mit der Leberclearance (Abbildung 4). Für die Cholesterinclearance ist bekannt, dass sie durch eine Cholestase beeinflusst wird. Hier konnte ergänzend durch die negative Korrelation zwischen der Leberclearance und der alkalischen Phosphatase gezeigt werden, dass auch die Clearance der pflanzlichen Sterine durch die Cholestase beeinträchtigt wird. Die durch die Cholestase verminderte Clearance ist wahrscheinlich durch die veränderte Aktivität der ABCG5/G8 Transporter in der Leber entstanden. ABCG5/G8 Transporter sind die wichtigsten Transporter für Sterine von der Leber in die Galle. Dies konnte nicht nur an ABCG5/G8 Knock-out Mäusen [17, 28, 29], sondern auch bei einem Patienten mit Sitosterinämie [30], sowie durch Bestimmung der fäkalen Ausscheidung von Cholesterin [21] nachgewiesen werden. Die Transporter verloren nicht ihre Differenzierungsfähigkeit. Sitosterin hatte eine höhere Clearance als Campesterin und Cholesterin hatte die niedrigste [1]. Abbildung 3 zeigt die Korrelation zwischen der Clearance von Campesterin und Sitosterin. Campesterin und Sitosterin korrelieren im Serum miteinander, folglich war das auch von ihrer Clearance zu erwarten. Es erschien dennoch wichtig dies zu zeigen und auch dass sie signifikant unterschiedlich sind. Dies unterstreicht, dass trotz des unterschiedlichen Schweregrads der Lebererkrankungen die Unterschiede in der Elimination bzw. die Clearance erhalten bleibt. Die pflanzlichen Sterine und Stanole haben alle das Grundgerüst des Cholesterins. Sie unterscheiden sich vom Cholesterin durch eine zusätzliche Methyl- bzw. Ethylgruppe am C₂₄ und Doppelbindungen bzw. gesättigten Bindungen am C₅ oder C₂₂. Campestanol, welches zusammen mit Sitostanol, die höchste Clearance hatte, unterscheidet sich vom Cholesterin durch eine gesättigten Bindung am C₅ und eine Methylseitenkette am C₂₄. Sitostanol ist ebenfalls eine gesättigte Verbindung, allerdings mit einer Ethylgruppe am C₂₄. ABCG5/G8 beschleunigt die Elimination von Stanolen (delta 5 α - gesättigt) mit Alkylresten an der Seitenkette (Methyl-, Ethylgruppe). Diese Befunde stimmen mit den Daten von Igel et al. überein [31]. Die Autoren hatten die Plasmakonzentrationen von Sterinen und Stanolen bei Mäusen nach Verabreichung von deuterierten Sterinen und Stanolen gemessen. Der ABCG5/G8 Transporter sitzt sowohl in der Darmwand, als auch in der Leber, daher kann man diese Ergebnisse vergleichen. Cholestanol als gesättigte Verbindung ohne zusätzliche Gruppe an der Seitenkette hatte eine wesentlich niedrigere Clearance. Die Länge der Seitenkette war ein wichtigeres Kriterium für die Affinität zum Transporter als die Sättigung der Substanz [31]. Die

zweite Transportpriorität hatten 2-fach ungesättigte Stoffe mit Seitenkette. Stigmasterin mit einer Ethylgruppe am C₂₄ und einer ungesättigten Doppelbindungen am C₅ und am C₂₂ hatte Vorrang vor Brassicasterin, welches eine Methylgruppe aufweist.

Brassicasterin unterscheidet sich von Campesterin durch eine Doppelbindung am C₂₂. Diese Doppelbindung bedingte eine im Mittel 2.1-mal höhere Clearance von Brassicasterin gegenüber Campesterin. Auch Stigmasterin ist durch eine Doppelbindung am C₂₂ gekennzeichnet und unterscheidet sich durch sie vom Sitosterin. Die Clearance von Stigmasterin lag im Mittel 2.6-mal höher als von Sitosterin. Die Doppelbindung am C₂₂ ist demnach ein wichtiger Faktor bei der Selektion des Substrates durch ABCG5/G8. Andere Studien zeigen, dass die Länge der Seitenkette einen Einfluss auf die Auswahl der Substanz durch den Transporter hat [19, 31]. Die Sättigung am C₂₂ spielt hingegen keine Rolle [19]. Sitosterin, welches eine Ethylgruppe am C₂₄ trägt, hat eine höhere Clearance als Campesterin, das eine Methylseitenkette hat. Die Gruppen an der Seitenkette scheinen demnach auch ein wichtiges Differenzierungsmerkmal zu sein. Verbindungen mit Ethylgruppen werden bevorzugt vor Verbindungen mit Methylgruppen an der Seitenkette (C₂₄) transportiert. Insgesamt zeigte sich, dass je komplexer die Strukturveränderung gegenüber Cholesterin ist, desto größer ist die Affinität zum Transporter und umso schneller wird die Substanz ausgeschieden [31].

Die Clearance hängt aber nicht nur von der Struktur der Stoffe ab, sondern auch von der Ausprägung des ABCG5/G8 Transporters. Die autosomal rezessive Erbkrankheit, Sitosterinämie, hat eine Mutation auf Chromosom 2p zur Ursache. Die Folge ist ein Transportdefekt, der eine Hyperabsorption und verminderte hepatische Elimination von Sterinen und Stanolen bedingt. Auch für die Mutation heterozygote Patienten zeigten eine höhere Absorption von Sterinen und Stanolen im Vergleich zu Patienten ohne jegliche Mutation an dieser Stelle [32]. Die Bedeutung der Leber in der Sterinhomöostase konnte kürzlich von Mietinen et al. nachgewiesen werden. Die Autoren zeigten bei einem Patienten mit Sitosterinämie, dass die Sterinkonzentrationen im Blut nach einer Lebertransplantation drastisch abnahmen [33]. Daraus ließ sich schließen, dass die Elimination von Sterinen über ABCG5/G8 Transporter in der Leber eine entscheidendere Rolle für die Serumkonzentrationen von Sterinen spielt, als die Resorptionshemmung im Darm. Die individuell sehr verschiedenen Serum- und Gallenkonzentrationen und damit auch die Clearance könnte auf die unterschiedliche Ausprägung des ABCG5/G8 Transporters zurückzuführen sein. Die Genetik der Patienten wurde nicht untersucht. Auch die mögliche Beeinflussung der Ausprägung des Transporters durch die Aufnahme von Oxysterinen und

pflanzlichen Sterinen mit der Nahrung wurde nicht untersucht. LXR kann bei Aktivierung durch diese Liganden auf mRNA Ebene eine Genexpression induzieren [16, 17] und damit die Anzahl der ABCG5/G8 Transporter erhöhen.

Der ABCG5/G8 Transporter befördert Substanzen von der Leber in die Galle und trägt somit wesentlich zur Clearance von Sterinen und Stanolen bei. Die Clearance hängt damit von der Anzahl und Aktivität der ABCG5/G8 Transporter ab. Dies steht zum einen mit der genetischen Voraussetzung des einzelnen Patienten, zum anderen mit einer möglichen Genexpression auf mRNA Ebene und mit der Leberschädigung der Patienten in Zusammenhang. Des Weiteren wird die Clearance von der Struktur der Substanzen selbst bestimmt. Stanole werden vor Sterinen transportiert. Bei den Sterinen werden solche mit zwei Doppelbindungen bevorzugt vor solchen mit nur einer Doppelbindung befördert. Außerdem werden Substanzen mit einer Ethylgruppe an der Seitenkette vor denen mit einer Methylgruppe an der Seitenkette transportiert. Diese Differenzierungsfähigkeit zwischen den einzelnen Substanzen zeigt der ABCG5/G8 Transporter sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit Lebererkrankungen. Dennoch ist die Clearance nicht bei allen Menschen gleich, weder bei Erkrankten noch bei Gesunden, da sie, wie oben beschrieben, aufgrund der Genetik individuelle Unterschiede aufweist.

Die Lipidinfusion, die bei Patient 1 infundiert wurde, enthielt 3.2-mal so viel Sitosterin wie Campesterin und noch weitere pflanzliche Sterine und Stanole, wobei Stigmasterin und Campesterin ungefähr in gleich hoher Konzentration zugeführt wurden. So ist es zu erklären, dass die Stigmasterinkonzentration im Serum bei diesem Patienten 4.1-mal so hoch war wie die mittlere Konzentration der fünf anderen Patienten. Die Leberclearance von Patient 1 wies aber keinen wesentlichen Unterschied zu der der anderen Patienten auf. Die Konzentrationen waren nicht nur im Serum erhöht, sondern auch in der Galle. Daher war keine Anreicherung der Stoffe im Körper zu befürchten.

Patient 3 hatte die niedrigste Cholesterinkonzentration, was durch die Therapie mit Atorvastatin, einem Cholesterinsyntheseblocker, bedingt war.

Die Einnahme von Ursodesoxycholsäure bei Patient 2 und 3 zeigte keinen Effekt auf die Clearance. Ursodesoxycholsäure vermindert die Cholesterinsättigung der Galle durch Senkung der Cholesterinabsorption im Darm und Senkung der Cholesterinsekretion in die Galle [34, 35]. Die Clearancewerte verhielten sich bei diesen Patienten genauso wie bei den vier anderen, daher war nicht von einer Beeinflussung der ABCG5/G8 Transporter auszugehen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Sitosterin- und Campesterinkonzentration unter

Ursodesoxycholsäureeinnahme um 40% bzw. 53% höher lagen als bei Patienten, die keine Ursodesoxycholsäure bekamen [36]. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Auch die Einnahme von Atorvastatin, schien die Leberclearance von Patient 3 nicht zu beeinflussen. Um eine sichere Aussage über den Einfluss von Ursodesoxycholsäure und Atorvastatin auf die Clearance machen zu können, ist dieses Patientenkollektiv zu klein.

Patient 6 hatte die niedrigsten pflanzlichen Sterinkonzentrationen im Serum von allen Patienten. Dies könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die nasobiliäre Sonde bereits 20 Tage lag, als die Proben genommen wurden und dadurch auch von einer deutlich verminderten Sterinresorption durch die biliäre Drainage auszugehen war. Bei den Clearancewerten zeigten sich nur für Sitostanol und Campestanol niedrigere Werte, als bei den anderen Patienten.

Die Patienten 2 und 3 wurden aufgrund einer Infektion mit Antibiotika behandelt. Einige Antibiotika können zur Cholestase führen. Für das Penicillinderivat, das diese beiden Patienten erhielten, ist dies nur in Einzelfällen beschrieben. Patient 2 hatte für alle untersuchten Stoffe, bis auf Sitostanol, die höchste Clearance. Daraus ließ sich schließen, dass die Clearance nicht durch die Antibiotikaeinnahme beeinflusst wurde.

Zu beachten ist, dass die Berechnung der Clearance die endogene Verstoffwechslung nicht berücksichtigt. Deswegen geben die Werte nicht die endgültige Clearance wieder. Cholesterin wird sowohl über die Nahrung aufgenommen, als auch in der Leber synthetisiert. Es kann im Körper in VLDL (very low density lipoproteins) und LDL (low density lipoproteins) eingebaut werden und in Cholestanol, seine gesättigte Form oder mit Hilfe von ACAT 1 (Acyl-CoA-Cholesterolacyl-Transferase) oder ACAT 2 in Cholesterinoleate als Speicherform umgewandelt werden. ACAT 1 kann sowohl Cholesterin als auch Sitosterin verestern, ihre Aktivität ist gegenüber ACAT 2 relativ niedrig. ACAT 2 verwendet hauptsächlich Cholesterin als Substrat und nur zu einem geringen Teil Sitosterin. Es wird ca. 60-mal mehr Cholesterin zu Cholesterinoleat umgesetzt als Sitosterin [37, 38]. Man geht davon aus, dass pflanzliche Sterine durch endogene Mechanismen in Stanole umgewandelt werden können. Genau wie Cholesterin können pflanzliche Sterine durch Darmbakterien zu Koprostanolen und Koprostanen metabolisiert werden. Pflanzliche Sterine werden beim Menschen nicht in Gallensäuren umgewandelt [26]. Pflanzliche Stanole können demnach sowohl über die Nahrung aufgenommen werden, als auch aus pflanzlichen Sterinen in der Leber metabolisiert werden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden Stigmasterin und Sitosterin zu Sitostanol und Campesterin zu

Campestanol metabolisiert. Die Cholesterinclearance zeigte keine Korrelation zur Campestanol- oder Sitostanolclearance.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Leberclearance von Sterinen und Stanolen bei Patienten mit Lebererkrankung und biliärer Drainage untersucht. Der ABCG5/G8 Transporter hat dabei in der Leber eine wichtige Funktion. Dieser Transporter pumpt Cholesterin, Cholestanol, pflanzliche Sterine und Stanole von der Leber in die Galle.

Die an der Studie teilnehmenden Patienten hatten unterschiedliche Lebererkrankungen. Dies ermöglichte es zu untersuchen, wie sich die Leberclearance bei Patienten mit Lebererkrankungen verhält. Alle Patienten hatten eine nasobiliäre Sonde liegen, über die die Gewinnung der Gallenproben erfolgte. Blutserum wurde durch venöse Blutentnahmen entnommen. Die Proben wurden nach ihrer Aufarbeitung gaschromatographisch/massenspektrometrisch ausgewertet. Die hepatische Clearance wurde danach aus den Konzentrationen der Sterine und Stanole im Serum und in der Galle berechnet.

Es zeigte sich, dass die Clearancewerte der Patienten mit Lebererkrankungen deutlich niedriger waren als die in der Literatur bekannten Clearancewerte von gesunden Probanden. Die Serumkonzentrationen von Cholesterin, Sitosterin und Campesterin waren bei beiden Kollektiven annähernd gleich. Die Clearance variierte jedoch erheblich. Die Cholesterinclearance war bei Gesunden 4-mal höher als bei Patienten mit Lebererkrankungen. Die Clearance von Sitosterin war 13-mal, die von Campesterin 8-mal höher bei den aus der Literatur bekannten gesunden Probanden als bei dem untersuchten Patientenkollektiv. Dies zeigt, dass die Leberclearance von der Leberschädigung abhängt und es ließ sich nachweisen, dass sie eine negative Korrelation mit der alkalischen Phosphatase, als Parameter der Cholestase, aufweist. Der ABCG5/G8 Transporter ist der wichtigste Transporter für Sterine von der Leber in die Galle. Bei Patienten mit Cholestase transportiert er deutlich weniger Substanzen als bei gesunden Probanden, aber seine Differenzierungsfähigkeit zwischen den einzelnen Sterinen/Stanolen bleibt erhalten. Je komplexer der Strukturunterschied des Stoffes zum Cholesterin ist, umso bevorzugter wird er transportiert und damit ausgeschieden. Diese Reihenfolge des Transportes von Substanzen ist bei gesunden Probanden und bei Patienten mit Lebererkrankungen gleich. Die Aktivität und die Anzahl der ABCG5/G8 Transporter ist auch von den genetischen Voraussetzungen des Patienten abhängig.

Zusätzlich zeigte sich, dass die von den Patienten eingenommenen Medikamente keinen Einfluss auf die Clearance ausübten. Diese Aussage, wie auch die übrigen Aussagen der Studie, stehen

unter dem Vorbehalt eines kleinen Patientenkollektives. Die gewonnenen Erkenntnisse legen es jedoch nahe, in einer breiter angelegten Probanden- Patientenstudie, eine Bestätigung und Detaillierung der bisherigen Ergebnisse zu suchen, um hieraus die Erkenntnisse für den Sterinstoffwechsel zu erweitern.

6. Literaturverzeichnis

1. Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, et al. 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* 2002;51:860-863.
2. van Heek M, Compton DS, Davis HR. The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkeys. *Eur J Pharmacol* 2001;415:79-84.
3. van Heek M, Farley C, Compton DS, et al. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol* 2000;129:1748-1754.
4. Berge KE, Tian H, Graf GA, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-1775.
5. Lu K, Lee MH, Hazard S, et al. 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* 2001;69:278-290.
6. Kusters A, Kunne C, Looije N, Patel SB, Oude Elferink RP, Groen AK. The mechanism of Abcg5/Abcg8 in biliary cholesterol secretion in mice. *J Lipid Res* 2006;47:1959-1966
7. Plosch T, van der Veen JN, Havinga R, Huijkman NC, Bloks VW, Kuipers F. Abcg5/Abcg8-independent pathways contribute to hepatobiliary cholesterol secretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:414-423
8. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002;71:537-592.
9. Higgins CF, ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 1992;8:67-113.
10. Schmitz G, Langmann T, Heimerl S. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* 2001;42:1513-1520.
11. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11:1156-1166.

12. Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 1974;53:1033-1043.
13. Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V. Sitosterolemia. *J Lipid Res* 1992;33:945-955.
14. Sudhop T, Gottwald BM, von Bergmann K. Serum plant sterols as a potential risk factor for coronary heart disease. *Metabolism* 2002;51:1519-1521.
15. Heimerl S, Langmann T, Moehle C, et al. Mutations in the human ATP-binding cassette transporters ABCG5 and ABCG8 in sitosterolemia. *Hum Mutat* 2002;20:151.
16. Allayee H, Laffitte BA, Lusic AJ. Biochemistry. An absorbing study of cholesterol. *Science* 2000;290:1709-1711.
17. Yu L, York J, von Bergmann K, Lütjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003;278:15565-15570.
18. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003;278:36091-36098.
19. Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 1993;23:827-831.
20. Salen G, Shore V, Tint GS, et al. Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res* 1989;30:1319-1330.
21. Lütjohann D, Björkhem I, Beil UF, von Bergmann K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* 1995;36:1763-1773.
22. Ostlund RE, Jr., Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002;22:533-549.
23. Normen AL, Brants HA, Voorrips LE, Andersson HA, van den Brandt PA, Goldbohm RA. Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* 2001;74:141-148.
24. Czubayko F, Beumers B, Lammsfuss S, Lütjohann D, von Bergmann K. A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. *J Lipid Res* 1991;32:1861-1867.

25. Salen G, Kwiterovich PO, Jr., Shefer S, et al. Increased plasma cholestanol and 5 alpha-saturated plant sterol derivatives in subjects with sitosterolemia and xanthomatosis. *J Lipid Res* 1985;26:203-209.
26. Boberg KM, Einarsson K, Bjorkhem I. Apparent lack of conversion of sitosterol into C24-bile acids in humans. *J Lipid Res* 1990;31:1083-1088.
27. Grundy SM, Ahrens EH, Jr. Measurements of cholesterol turnover, synthesis, and absorption in man, carried out by isotope kinetic and sterol balance methods. *J Lipid Res* 1969;10:91-107.
28. Langheim S, Yu L, von Bergmann K, Lütjohann D, Xu F, Hobbs HH, Cohen JC. ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J Lipid Res* 2005;46:1732-1738.
29. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, von Bergmann K, Lütjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16237-16242.
30. Miettinen TA, Phytosterolaemia, xanthomatosis and premature atherosclerotic arterial disease: a case with high plant sterol absorption, impaired sterol elimination and low cholesterol synthesis. *Eur J Clin Invest* 1980;10:27-35.
31. Igel M, Giesa U, Lütjohann D, von Bergmann K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* 2003;44:533-538.
32. Salen G, Xu G, Tint GS, Batta AK, Shefer S. Hyperabsorption and retention of campestanol in a sitosterolemic homozygote: comparison with her mother and three control subjects. *J Lipid Res* 2000;41:1883-1889.
33. Miettinen TA, Klett EL, Gylling H, Isoniemi H, Patel SB. Liver transplantation in a patient with sitosterolemia and cirrhosis. *Gastroenterology* 2006;130:542-547.
34. von Bergmann K, Epple-Gutsfeld M, Leiss O. Differences in the effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on biliary lipid secretion and bile acid synthesis in patients with gallstones. *Gastroenterology* 1984;87:136-143.
35. Leiss O, von Bergmann K, Streicher U, Strotkoetter H. Effect of three different dihydroxy bile acids on intestinal cholesterol absorption in normal volunteers. *Gastroenterology* 1984;87:144-149.

36. Lindenthal B, Sudhop T, Schiedermaier P, Agnan M, Sauerbruch T, von Bergmann K. Serum plant sterols and biliary cholesterol secretion in humans: studies with ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res* 2002;43:1072-1077.
37. Field FJ, Mathur SN. beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J Lipid Res* 1983;24:409-417.
38. Temel RE, Gebre AK, Parks JS, Rudel LL. Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *J Biol Chem* 2003;278:47594-47601.

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. von Bergmann für die Vergabe des interessanten Themas und seinen Anregungen zur Ausarbeitung.

Für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Proben und der Unterstützung im Labor danke ich Frau Friedrichs.

Des weiteren danke ich Frau Dr. Liebing, Herrn Dr. Brzezinka, Herrn PD Dr. Dr. Lütjohan und Frau Zerlett für ihre zahlreichen Ratschläge und ihre Unterstützung.

Ein herzlicher Dank gilt schließlich meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung in allen Phasen meines Studiums und meiner Dissertation, aber auch dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben.